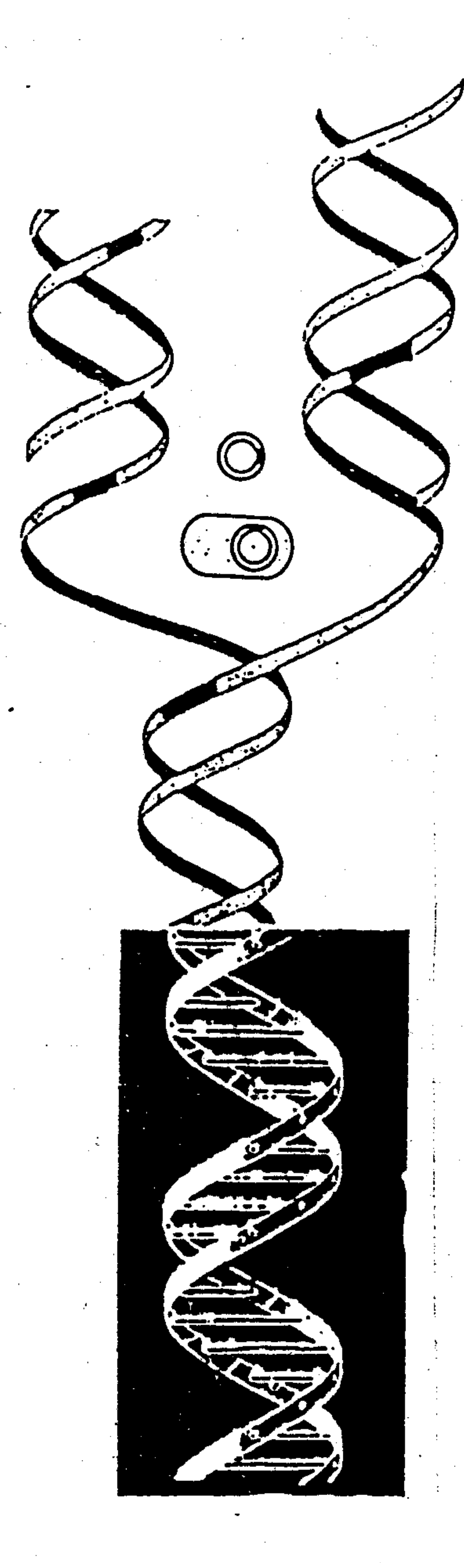


الوراثة
و
الهندسة الوراثية

مدخل إلى تكنولوچيا الچينات

دكتور

هاشم أحمد حسين

أستاذ الوراثة - كلية الزراعة

جامعة القاهرة

الجزء الثانى

رقم الإيداع بدار الكتب

٩٠٠٧ / ١٩٨٩

الجزء الثانى
الهندسة الوراثية
وتكنولوجيا الجينات

(الباب الثالث عشر)

الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية

Molecular Genetics and Genetic Engineering

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

مقدمة :

قبل اكتشاف التركيب الكيميائي للمادة الوراثية ، كان ينظر إلى " الجين " على أنه مجرد وحدة توارث غير قابلة للانقسام (مثل الاعتقاد القديم فى الذَّرة بأنها أصغر وحدة للمادة ، وأنها غير قابلة للانقسام) . ويُطلَق على الفترة السابقة لاكتشاف التركيب البنائى للمادة الوراثية " بعصر علم الوراثة التقليدى " . ولقد كان هذا العلم فى ذلك العصر ناجحا للغاية فى استيضاح كثير من القواعد البيولوجية الأساسية بالرغم من عدم معرفة طبيعة الجين نفسه . أما عصر الوراثة الجزيئية فقد تلى اكتشاف تركيب الد ن أ DNA وذلك عندما حُدِّدت الوحدة الأساسية للتوارث وهى نوتيدة الد ن أ ، ووجد أن " الجين " (وهو وحدة الوظيفة) يتكون من تتابع Sequence من النوتيدات .

وعادة ما يتميز التسلسل التاريخى لمعظم الأنظمة العلمية بفترات طويلة نسبيا من الركود ، غالبا ما تتخللها قفزات سريعة من التقدم المثير ، وتنبع معظم هذه القفزات المثيرة من البحث ، ومن النمو التكنولوجى الحديث . وهذا الوصف التاريخى ينطبق ـ حقيقة على علوم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية .

معالم التحول فى منظور الفكر العلمى وعلم الوراثة الحديث:

Landmark Changes in Perspectives and Modern Genetics

لواعتبرنا السنوات الأخيرة من حقبة الثمانينات تمثل قمة التقدم فى علوم البيولوجيا ،فيمكننا أن نُحَدِّد التحولات الجَذْرية فى الفكر الوراثى منذأن أوضح إيفرى Avery ومعاونوه عام (١٩٤٤) أنّ الدنأ هو المادة الوراثية . وفيما يلى عرض للسنوات التى تمثل معالِم تحوّل فى الاكتشافات ذات الأهمية العلمية والتطبيقية فى مجال علوم الوراثة :

١٩٤٨ : أوضح كل من بيدل وتيتم Beadle and Tatum أنّ الجين يُشَفِّر لوحدة بروتين .

١٩٥٣ : اقترح كل من واطسون وكريك Watson and Crick التركيب الحلزونى المزدوج للدنأ .

١٩٥٨ : بيّن كل من ميسلسون وشتال Meselson & Stahl أن الدنأ يتناسخ بالطريقة شبه المحافظة .

١٩٦١ : تم اكتشاف الطبيعة الثلاثية للشفرة الوراثية .

- تم اكتشاف الرنأ ناسخ الشفرة Messenger RNA.
- اقترح جاكوب ومونود Jacob and Monod نظرية الأوبرون Operon Model لتنظيم عمل الجين .

١٩٧٠ : اكتشف كل من تيمِن وبالتيمور Temin and Baltimore إنزيم النَّسْخ العكسى Reverse Transcriptase فى ڤيروسات الريتروفيروس retrovirus (الفيروسات التى تتكاثر من خلال التبدل إلى دنأ مزدوج) .

١٩٧٤ : تمّ ازدراع cloning جينات ميزات النوى Eukaryotic genes.

فى البلازميدات البكتيريـــــة •

١٩٧٧ :اصبح تحديد تتابعات Sequencing الـ د ن أ ممكناً .

.تم اكتشاف الوحدات الجينية المنفصلة .. Interrupted genes

. كما أمكن فصـــل نُسَــخ transcripts منهـــا .

١٩٨١ : تم اكتشاف النشاط المُحَفِّز catalytic activity للـ ر ن أ.

• أمكن الحصول على فئران وذباب مهندس وراثيا Transgenic

عن طريق إدخال د ن أ جديد فى النسيلة التوالدية germ line.

وامازالت سرعة الاكتشافات العلمية فى مجال الوراثة فى أوج نشاطـــــها • والذى يبدو الآن أنه اكتشافات جوهرية يرتبط بموضوعات محددة بالمقارنـــة بالاكتشاف الرئيسيـة فى الفترة السابقة • ويهتم العلماء الآن باستبيان إمكانيـــة إعادة تنظيم الـ د ن أ أو نقله من كائن لآخر -أكثر من البحث فى تركيبه الأساسى أو طريقة تناسخه • وفى الوقت الحاضر يمكن القول أنه لانهاية لما يمكن اكتشافه سواء من الناحية العلمية أو العملية -من خبايا الـ د ن أ وطريقة تعبيره عـــن ذاتـــه •

وفى الأجزاء التالية سوف نستعرض بشىء من التفصيل أهم الاكتشافات والتقنيات فى المجالات الفيزيائية والكيميحيوية والبيولوجية الجزيئية الـــتى لعبت أدواراً رئيسية فى تطوير منظور وفكر علماء الوراثة والتى أدت الـــى تحَوّلات جوهرية فى مجال البحث الوراثى الحديث وخاصة فى مجالات إنزيمات الأحماض النووية ودورها فى إعادة تنظيم المادة الوراثية وتخليق جزيئات د ن أ مطعمة recombinant DNA molecules وتحريك الجينات لتشـــيـيـد كائنات مهندسة وراثيـا genetically engineered أو مايسمــــى بـــ Transgenic organisms.

ويوجد ـ على الأقل ـ ثلاثة مجالات رئيسية من التكنولوجيا كا ن لـهـا تأثير فعال فى مجال العلوم البيولوجية ،وهى التى مهدت الطريق واسعـا للدخـول فى عصـر الهندسـة الوراثيـة،وهى :

١ـ توفر أجهزة التحاليل الدقيقة ذات الحساسية الفائقة .
٢ـ اكتشاف النظائر المشعة .
٣ـ اكتشاف إنزيمات الأحماض النووية .

أولا : أجهزة التحاليل الدقيقة وطرق البحث :

لقد صُمِّم جهاز التحليل بالطرد المركزى الفوقى Ultracentrifuge فى حقبة العشرينات بواسطة العالم تيودر سفيدبيرج (Theodor Svedberg). إن معدل الترسيب Sedimentation rate لمادة ما ـ أثناء عملية الطرد المركزى الفوقى ، هى فى الأساس دالـة لحجمه ثم لشكله . ووحدة الترسيب (S) (حرف S نسبة إلـى سفيدبير ج) هى تعبير عن معالم هذه المادة . ولقد تمّ تطوير هـذا الجهـاز لامكان عزل عضيات الخلية Organelles ، مثل النـوى والريبوسومات والميتوكوندريات والبلاستيدات الخُضر وغيرها ، كما يمكـن استعمال هذا الجهاز فى تحديد أقل عدد من الجزيئات الضخمـة Macromolecules فى عينة بيولوجية ، كما يمكن استعماله أيضا فى تقدير الأوزان الجزيئية لهذه الجزئيـات .

وفى حقبة الثلاثينات ، تم اختراع المجهر الالكترونى . ولقد مكّن

ذلك - ليس فقط - من رؤية التراكيب الخلوية الدقيقة ، لكن أيضا من رؤية الفيروسات والجزيئات البيولوجية الضخمة . ومن أهم استخدامات المجهر الالكترونى بيان أن الخرائط الوراثية الدائرية للبكتريات لها تركيب مادى دائرى . كما أمكن - باستخدام هذا الجهاز - رؤية الريبوسومات المتعددة المتصلة بجزئ الم . ر ن أ (m RNA).

كما أن طرق التفريد الكهربائى Electrophoresis هى تكنيكات تعمل على فصل الجزيئات طبقا لشحنتها الخالصة فى مجال كهربى، عادة على بيئة تحميل صلبة أو شبه صلبة كالورق أو الآجار أو جل البولى أكريل أمايد PAAG . ولقد كان العالم لينوس باولنج Linus Pauling من أوائل من استخدموا هذا التكنيك لتمييز هيموجلوبين الخلايا المنجلية من الهيموجلوبين العادى . وبواسطة تحليل تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين ، تمكن باولنج من تحديد الفرق فى الحركيات الألكتروفورية لهذه البروتينات ، والذى كان نتيجة لاختلاف نوعى الهيموجلوبين فى حمض أمينى واحد فى سلاسل البيتا (β) . كما تمكن كل من العالمين " والترجلبرت" و " ألان ماكسان " من تصميم تكنيك تفريد كهربى سريع لتحديد التتابع النوتيدى لشظايا د ن أ (DNA fragments) تبلغ فى الطول حوالى ١٠٠ زوج من القواعد . كما استعملت بكثرة طرق التفريد الكهربى لتمييز مشابهات الانزيمات (isozymes) وهى بروتينات لها نفس خصائص الانزيمات لكنها تختلف فى التركيب الأولى .

وتوضح بيانات انكسار الأشعة السينية النافذة من المواد المتبلورة ،

والتى حُلِّلت بواسطة الحاسب الآلى ـ الأشكال ثلاثية الأبعاد للاحماض النووية (مثل الـ د ن أ وأنواع ت · ر ن أ RNA's t) والبروتينات (مثل الميوجلوبين وأغلفة الڤيروسات والانزيمات) ·

وفى خلال منتصف حقبة الاربعينات ، وأوائل حقبة الخمسينات طُوِّرت أنظمة مختلفة من الكروماتوجرافيا ، مكّنت من فصل الجزيئات عن بعضها بواسطة الاختلافات فى درجة ذوبانها فى المذيبات العضوية وفى شحنتها الكهربية وفى وزنها الجزيئى وفى خصائصها المميزة للارتباط بالبيئة الحاملة لها ، أو بواسطة توافيق عديدة من هذه العوامل · ولقد استعمل العالم "إروين شارجاف "Erwin Chargaff" الكروماتوجرافيا الورقية لتقدير القواعد المكونة لجزيئات الـ د ن أ من مصادر مختلفة · وكما سبق أن ذكرنا فى الباب الثانى ، فلقد وجد شارجاف أن النسبة الجزيئية للأدنين كانت مكافئة لنسبة الثيمين ، وأن نسبة الجوانين كانت مساوية لنسبة السيتوسين · وكان هذا الاكتشاف هو مفتاح الحل فى البحث عن تركيب الـ د ن أ بواسطة كل من واطسون وكريك عام ١٩٥٣ ·

ولقد ظهرت تكنيكات عديدة لفصل مناطق او لكسر جزيئات الأحماض النووية · ويعرف فصل السلسلتين المتكاملتين لجزئ الـ د ن أ بتغير طبيعة هذا الجزئ · وتتغير طبيعة الـ د ن أ لو وضع فى ماء مقطر أو عندما يوضع فى ماء مغلى · والطريقة الاخيرة تسمى "الاذابة" · ويمكن معرفة انفصال خيوط الـ د ن أ عن بعضها بواسطة أجهزة القياس الضوئى (Spectrophotometric) ، على أساس أنّ الكثافة الضوئية

أو الامتصاص الضوئى عند (Optical density = Od) طول موجه قدرها ٢٦٠ نانوميتر (٢٦٠٠ أنجستروم) تتزايد أثناء عملية الذوبان . وتعرف درجة الحرارة التى يكون عندها التزايد فى الكثافة الضوئية (Od_{260}) ٥٠ ٪ مما يمكن الوصول إليه وعندما يكون الانفصال تاما - باسم درجة حرارة الذوبان (Melting Temperature) (Tm) ولان زوج القواعد ج ، س يترابط هيدروجينيا بثلاث روابط ، بينما زوج القواعد أ ، ث يترابط هيدروجينيا برابطتين ، فإن درجة حرارة الذوبان تكون أعلى عندما يكون محتوى الد ن أ من القواعد ج - س أعلى . ويكون الذوبان أسرع عندما تتواجد تجمعات من قواعد الأدنين (أ) وقواعد الثيمين (ث) ، وكذلك عندما تكون البيورينات (أ و ج) على خيط واحد ، وكل البيريميدينات (ث و س) على الخيط المقابل .

فصل الخيوط المزدوجة للد ن أ :

عندما يُعرّض الد ن أ للغليان ثم التبريد الشديد المفاجىء (صدمة حرارية) فان الخيوط المزدوجة سوف تتفكك من بعضها وتظل فى حالة مفردة ، أما لو تم التبريد ببطء ، فإن الخيوط التكاملية سوف تتزاوج قواعدها ، ويعاد مرة أخرى تكوين جزيئات د ن أ مزدوجة الحلزون. ويمكن تكوين جزيئات هجينة من الد ن أ - ر ن أ من خيوط فردية بعمليات مماثلة .

ويمكن أن يُحلّل الر ن أ كلية إلى نوتيدات وذلك بتعريضه لدرجة

عالية من تركيز أيون الهيدروجـين pH (محلول عالى القلوية) • ويمكن استعمال هذه الخاصية فى تنقية الد ن أ من خليـط من كل من الد ن أ والر ن أ ، حيث يبقى خيط الد ن أ الفردى ملتصقا فى المرشـحات الغشائية المصنوعة من مادة النيتروسليولوز • بينما تمر خيـوط الر ن أ من هـذه المرشحات •

طرق تقطيع خيوط الد ن أ الطويلـة :

توجد طريقتان أساسيتان لتقطيع خيوط الد ن أ الطويلة إلى شظايا ذات حجم مناسـب لتحديد تتابعات القواعد بها ، أو لاستخدامها فـى توافيق الهندسـة الوراثية • وهاتان الطريقتان هما :

(١) التجريد بالقص Shear Degradation :

إذا عُرِّض محلول من الد ن أ إلى قوة التحريك الخاصة بمقلـب وارنج (Waring Blender) أو إذا دُفِع المحلول خـلال أنبوبة ضيقة أو ثقب ضيق ، فان نهايات خيـوط الد ن أ الطويلة سـوف تتحرك — عادة — بسرعات مختلفة • وهذه العملية يترتب عليها شـدّ خيوط الد ن أ ثم قطعها بالقرب من المنتصف • وكلما كانت سرعة قـوة التحريك أكبر خلال الثقب الضيق ، كلما كانت قوة التجريد بالقص أكـبر . ويتزايد تأثير أى قـوة تجريد مع تزايد الحجم الجزيئى للجزىء ، لكنهـا تتناقص مع زيادة التركيز (وذلك لان تشابك جزيئات الد ن أ يقلل مـن قدرتها على الامتطاط) •

(٢) المعاملة بانزيمات القطع المتخصصة :

يمكن استعمال انزيمات القطع Restriction enzymes في تقطيع خيوط الد ن أ الطويلة الى شظايا محددة - وسوف نتناول هذا الموضوع بشيء من التفصيل تحت موضوع انزيمات الاحماض النووية .

ثانيا : الكاشفات النشطة إشعاعيا Radioactive Tracers :

يمكن استعمال العناصر النشطة إشعاعيا كواسمات عالية الحساسية لكشف وجود الكميات الضئيلة من جزيئات ضخمة محددة . وفيما يلى مثال يوضح ذلك :

وَسَمَ كلّ من هيرشى وتشيز مكونات الحمض النووى والبروتين الخاصة بالفاجات T2 . ولقد استعملا لذلك النظير المشع للفوسفور فو ٣٢ (^{32}p) بدلا من الفوسفور العادى فو ٣١ (^{31}p) لوسم الد ن أ . والنظير المشع للكبريت كب ٣٥ (^{35}S) بدلا من الكبريت العادى كب ٣٢ (^{32}S) لوسم البروتين (السيستايين والمثيونين كلاهما من الاحماض الامينية المحتوية للكبريت) . ونظراً لعدم وجود عنصر الفوسفور فى البروتينات وعدم وجود عنصر الكبريت فى الاحماض النووية فإن مصير كلٍّ من المكونين الفيروسيين يمكن تتبعه بدقة أثناء دورة حياة الفيروس . فبعد ما سُمح للفاجات بالتعلق بخلايا عائلة من إ . كولاى ، عُرِّض المخلوط لقوى تجريد فى مقلب وارنج Waring Blender ، ثم وُضع تحت قوى الطرد المركزى لترسيب الخلايا . وبعد ذلك حُدِّدَت الخصائص النشطة لكل مكوّن نووى مشع

radionuclide فى الراسب Pellet وفى المعلق Supernatant . فوجد أن كل الفوسفور المشع ^{32}P كان فى الراسب البكتيرى ، وكل الكبريت المشع ^{35}S كان فى المعلق ، كما وجد الفوسفور المشع (فو ٣٢) فى بعض من نسل الفاجات ، لكن لم يوجد بها كب ٣٥ . وبناء على ذلك فالاستنتاج هو أن الفاجات تدفع بالد ن أ الخاص بها الى داخل الخلايا العائلة . والمعاملة بقوة التحريك تفصل ألياف ذنب الفاج من مواقع إلتصاقها على أسطح الخلايا العائلة ، ومن ثم فأغلفة الفاج الخاوية المكونة من البروتين تبقى حرة فى المعلق .

ويستعمل اليود النشط إشعاعيا (ى ١٢٥ = ^{125}I) بكثرة لوسْم البروتينات ذات الأهمية الطبية (مثل : الهرمونات والمولدات antigens والبروتينات الفيروسية ... إلخ) . وهذا النظير يسهل تزاوجه مع الحمض الأمينى " تيروسين Tyrosine . والتقدير الكمى لكميات ضئيلة (فى حدود عدة نانوجرامات nanograms أو picograms بيكوجرامات فى المليلتر الواحد) من هذه البروتينات يمكن الوصول إليه بطرق تكنيكية معقدة .

ثالثا : إنزيمات الأحماض النووية Nucleic Acid Enzymes :

تلعب الانزيمات الموجودة داخل الخلايا أدوارا هامة فى العمليات الحيوية الاساسية مثل :

١ — تناسخ replication ونسخ transcription الد ن أ داخل الخلية .

٢ — هضم الد ن أ الغريب وغير المرغوب فيه فى الخلية (مثل د ن أ الفيروسات التى تصيب الخلية) .

٣- إلتئام repair الدنا التالف (أو الطافر) .

٤- تكوين التوليفات الجديدة recombinations بين جزيئات الدنا المختلفة .

ولقد تمكن علماء الوراثة الكيميحيوية - منذ حقبة الستينات من هذا القرن - من فصل وتنقية العديد من هذه الانزيمات من المستخلصات الخلوية ، كما تمكنوا أيضا من جعل هذه الانزيمات تقوم بوظائفها الحيوية الطبيعية تحت الظروف الاصطناعية في الأنبوب in vitro داخل المختبرات، وتمثل الانزيمات المُنَقّاة من المستخلصات الخلوية حجر الزاوية في تقنيات الهندسة الوراثية . لذلك فتحضير هذه الانزيمات عالية النقاوة يُمَثِّل صناعة قائمة بذاتها ، وهي تُقدِّم خدمة لاغنى عنها لعلماء البيولوجيا الجزيئية .

وفي خلال العشرين سنة الماضية ، طُوِّرت تقنيات المعالجة اليدوية للدنا باستخدام إنزيمات الأحماض النووية - وخاصة طُرُق قَطْع ولصق جزيئات الدنا. ولقد مكنت هذه الانزيمات من تناول هذه الجزيئات من زوايا عديدة مثل :

١- تقصير أطوال جزيئات الدنا .

٢- زيادة أطوال جزيئات الدنا .

٣- نَسْخ transcription جزيئات الدنا في صورة جزيئات رنا أو دنا .

٤- تحوير جزيئات الدنا بإضافة أو استبعاد مجموعات كيميائية محددة .

ولقد أمكن إجراء هذه المعالجات الاصطناعية في الأنبوب ، وأمكنها توفير الأساس العلمي للتقنيات الحديثة التالية :

أ- الاستزراع الجيني (كَلْوَنة الجينات) Gene cloning .

ب- إجراء الدراسات الكيميحيوية على الدنا ذاته .

جـ- دراسة تركيب وتنظيم الجين Gene structure .

د ـ التحكم فى تعبير الجينات Control of gene expression .

مجالات عمل إنزيمات الأحماض النووية :

نظرا لتنوع الوظائف التى تقوم بها الانزيمات التى لها علاقة بالد ن أ ، فلسوف نعرضها تحت خمس مجموعات عامة طبقا لنوعية التفاعل البيوكيميائى الذى تساعد فيه . وقبل الدخول فى تفاصيل عمل هذه الانزيمات ، يجب أن نوضح حقيقتين أساسيتين وهامتين ، هما :

ـ الحقيقة الأولى : بالرغم من أن معظم الانزيمات التى سوف نذكرها يمكن أن تنسب إلى مجموعة معينة ، إلا أن القليل منها يمكنه أن يساهم بأنشطة متعددة تنتمى إلى اثنتين أو أكثر من المجموعات الرئيسية . فمثلا ترتبط قدرة الكثير من إنزيمات البلمرة على تخليق جزيئات د ن أ جديدة بإمكانية قيام هذه الانزيمات بأنشطة تجريدية (degenerative) .

ـ الحقيقة الثانية : كما توجد إنزيمات لتداول الد ن أ ، يعرف أيضا مثيل لها قادر على العمل على جزيئات الر ن أ . ومن أمثلة ذلك إنزيم الريبونيوكلييز Ribenuclease ، الذى يستعمل فى استبعاد الر ن أ من تحضيرات الد ن أ . كما تجدر الاشارة إلى وجود إنزيمات لمعالجة الر ن أ لها استعمالات فى الاستزراع الجينى والهندسة الوراثية .

وفيما يلى عرض لمجموعات إنزيمات الد ن أ :

(١) إنزيمات النيوكلييز Nucleases :

وهى مجموعة من الانزيمات وظيفتها قطع أو تقصير أو تجريد جزيئات الأحماض النووية . وتقوم إنزيمات النيوكلييز بتجريد جزيئات الد ن أ وذلك بكسر الروابط الفوسفورية ثنائية الاستر (Phosphodiester bonds) التى

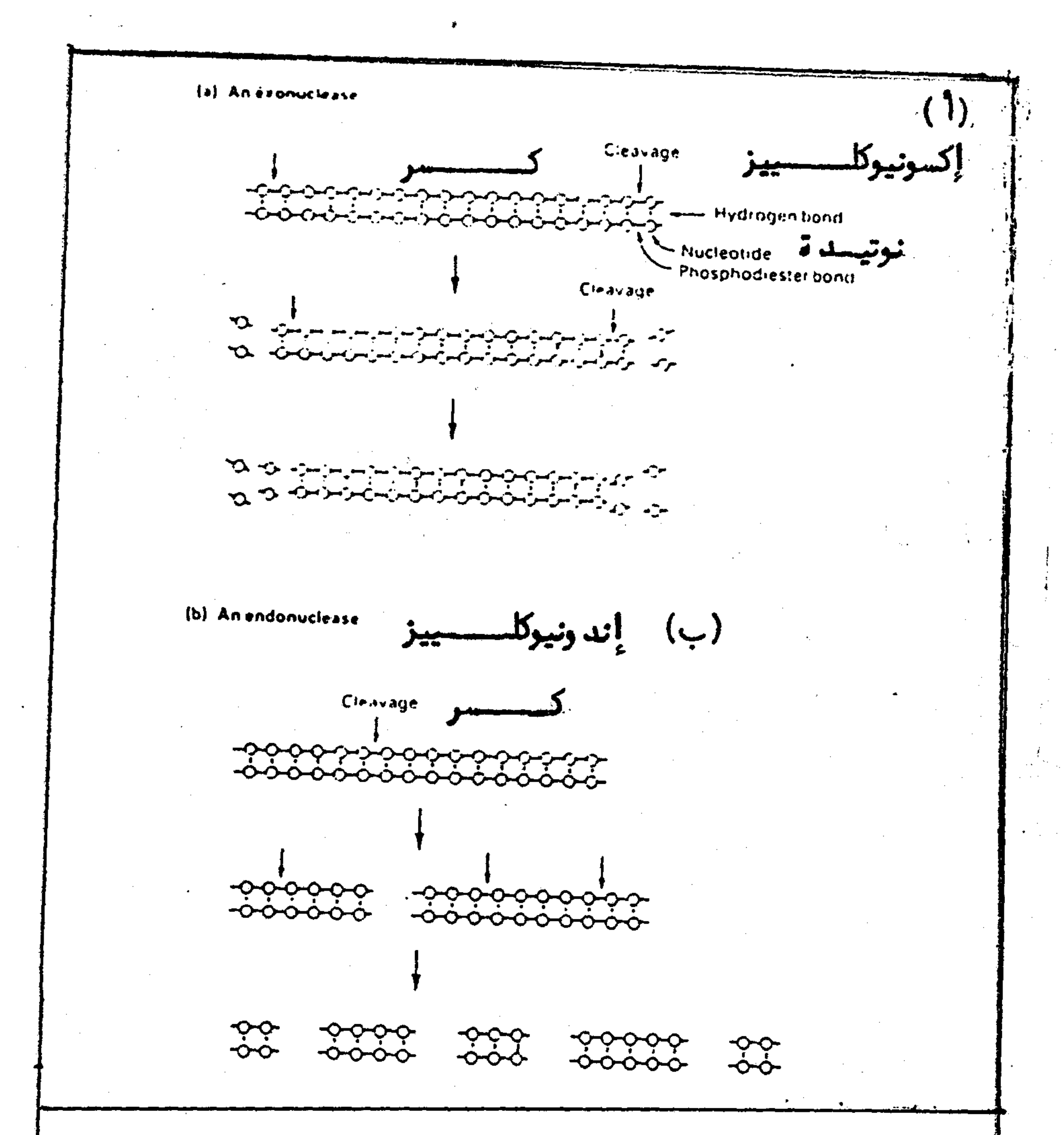
تربط النوتيدات المتجاورة فى خيط الـ د ن أ • ويعرف نوعان مُميَّزان من إنزيمات النيوكلييز (أنظر الشكل ١٣-١) :

- إنزيمات القطع الطرفية (إكسونيوكلييزس Exonucleases) وهذه تقوم بإزالة نوتيدة واحدة فى كل مرة من أحد طرفى جزئ الـ د ن أ •

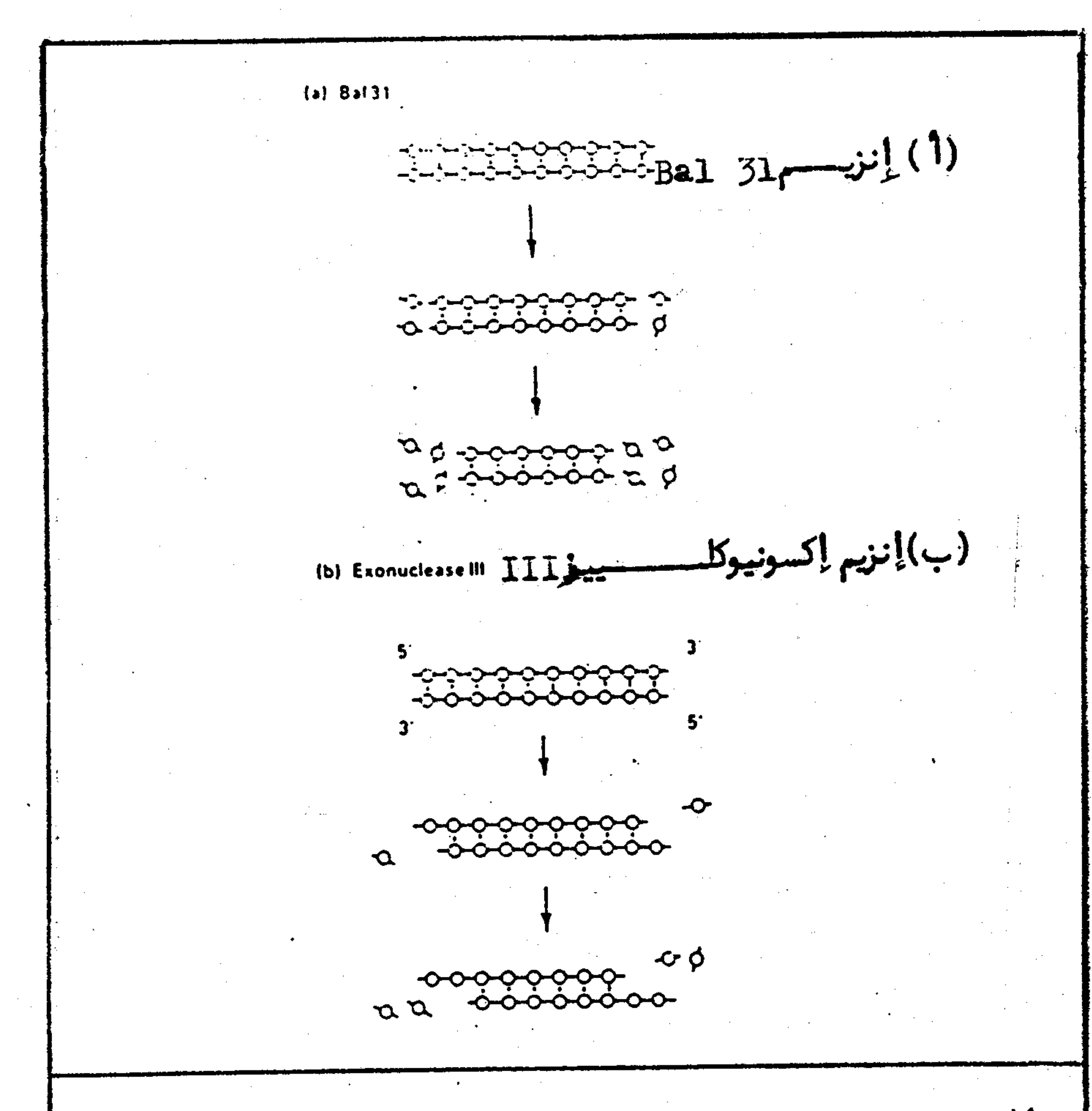
- إنزيمات القطع البينية (إند ونيوكلييزس Endonucleases) وهذه تقوم بكسر روابط الفوسفور ثنائية الاستر الداخلية فى داخل جزئ الـ د ن أ •

وينحصر الفارق الأساسى بين مختلف إنزيمات الأكسونيوكلييز فى عدد الخيوط التى تَتَجرَّد عندما تهاجم هذه الانزيمات جزيئا مزدوج الخيط • فعلى سبيل المثال ، يمثل الانزيم Bal 31 (وهو مستخلص من بكتريا Alteromonas espejiani) نموذجا لانزيم إكسونيوكلييز يمكنه إزالة نوتيدات فردية من كلا خيطى جزئ الـ د ن أ مزدوج الحلزون (الشكل ١٣-٢ أ) • وكلما زاد الوقت الذى يُسْمَح فيه للانزيم Bal 31 بالعمل على مجموعة من جزيئات الـ د ن أ ، كلما كانت شظايا الـ د ن أ الناتجة أقصر فى الطول • وعلى النقيض توجد إنزيمات مثل إنزيم الاكسونيوكلييز III (والمستخلص من بكتريا القولون E. coli) يمكنه أن يُجَرِّد خيطا واحدا فقط من الجزئ مزدوج الخيط مُعْطِيا - كناتج - د ن أ مفرد الخيط (الشكل ١٣-٢ب) •

وتُقَسَّم إنزيمات الإند ونيوكلييز بنفس الأسلوب ، فمثلا إنزيم الاند ونيوكلييز SI (مستخلص من فطر Aspergillus oryzae) يمكنه أن يُفَلِّج فقط جزيئات الـ د ن أ مفردة الخيط (الشكل ١٣-٣ أ) ، أما إنزيم الدنييز I (DNase I) - والذى يُحَضَّر من بنكرياس البقر ، فيقوم بتقطيع كل من جزيئات الـ د ن أ مفردة ومزدوجة الخيط على السواء (الشكل ١٣-٣ب) • وهذا



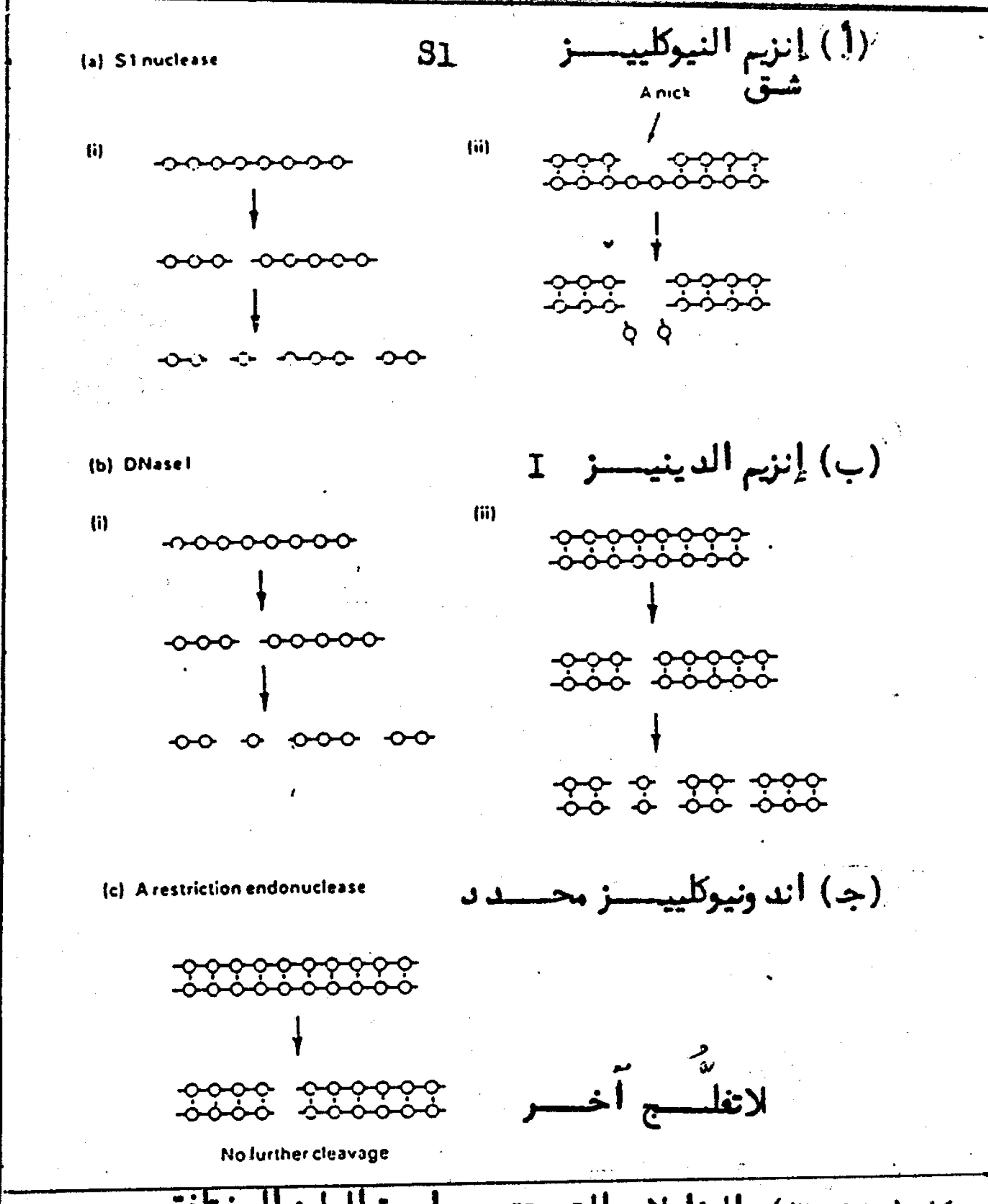
شكل (١٣ـ١) : التفاعلات التى تتم بمساعدة نوعين من إنزيمات النيوكلييز :
(أ) إنزيم إكسونيوكلييز يستبعد نوتيدات من طرف جزىء د ن أ
(ب) إنزيم إندونيوكلييز يَقْصِم الروابط الفوسفورية ثنائيـــة الإســـتر الداخليــــة ٠



شكل(١٣ـ٢) : التفاعلات التى تتم بمساعدة الطرز المختلفة من انزيمات الاكسونيوكلـــــــيز .

(أ) الانزيم Bal 31 الذى يستبعد نوتيدات مـــن كلا خيطى الجزئ المـــزدوج .

(ب) إنزيم الاكسونيوكلـــــيز III الذى يستبعـــــد نوتيدات من الطـــرف 3' فقـــــط .



شكل (١٣ـ٣) : التفاعلات التى تتم بمساعدة الطرز المختلفة من الاندونيوكلييز . (أ) إنزيم النيوكلييز S1 الذى يُفلِّج الـ د ن أ مفرد الخيط فقط وبضمنها الشقوق مفردة الخيط فى العديد من الجزيئات مزدوجة الخيط . (ب) إنزيم الدينيز I الذى يُفلِّج كلا من الـ د ن أ المفرد والمزدوج الخيط . (جـ) إنزيم إندونيوكلييز محدد يُفلِّج الـ د ن أ مزدوج الخيط ، لكن فقط فى عدد محدود من المواقع .

الانزيم الأخير غير متخصص ،بمعنى أنه يهاجم الد ن أ عند أية رابطة فوسفورية ثنائية الاستر ،وتكون النتيجة — عند إطالة فترة تأثيره — تكوّن مزيج من النوتيدات الفردية والنوتيدات المتعددة oligonucleotides القصيرة جدا .

وبخلاف ما سبق توجد مجموعة خاصة من إنزيمات الاندونيوكلييز— تسمى إنزيمات التحديد المتخصصة جدا Restriction endonucleases تقلع جزيئات الد ن أ مزدوجة الخيط فقط عند عددٍ محدود من مواقع محددة (تسمى مواقع التعرف recognition sites أو البالندرومات Pallindromes. ونظرا لأهمية هذه النوعية من الانزيمات فى تقنيات الهندسة الوراثية ،فسوف نتناولها بشىء من التفصيل فى جزء لاحق .

(٢) إنزيمات الليجيز Ligases :

وهى مجموعة من الانزيمات وظيفتها لصق جزيئات الأحماض النووية مع بعضها ،وهى تلعب دورا هاما خاصة فى ميكانيكيات إلتئام الـ د ن أ التالف . ويطلق عليها لاحمات الد ن أ DNA ligases وهى تعمل على إلتئام كسرات خيوط الد ن أ مفردة الخيط والتى تنشأ فى الجزيئات مزدوجة الخيوط أثناء تناسخ الد ن أ . وسوف نعرض فى جزء لاحق الدور الذى تقوم به هذه الانزيمات فى تشييد جزيئات الد ن أ المطعمة .

(٣) إنزيمات البلمرة Polymerases :

وهى مجموعة من الانزيمات تقوم بتخليق خيوط جديدة تكاملية من قوالب templates من الد ن أ الأصلى أو من الر ن أ . ويمكن لمعظم إنزيمات البلمرة أن تؤدى وظيفتها فقط إذا كان الخيط القالب من الد ن أ يمثل منطقة مزدوجة الخيط ،حيث تعمل هذه المنطقة كبادئة primer لاستهلال

عملية البلمرة . وتوجد ثلاثة أنشطة لانزيمات بلمرة الدنأ تستعمل بطريقة روتينية فى تقنيات الهندسة الوراثية :

(أ) إنزيم بلمرة الدنأ DNApolymerase I: يُحضّر هذا الانزيم عادة من بكتريا القولون (إ.كولاى) . ويقوم هذا الانزيم بالاتصال بمنطقة مفردة خيط الدنأ تسمى الشق nick (انظر الشكل ١٣ــ ٤ب) فى جزىء رئيسى مزدوج الخيط ،ثم بعد ذلك يتوسط فى تخليق خيط جديد كامل ، مجردا degenerating الخيط الموجود كلّما نما هذا الخيط الجديد . ومن ثمّ يمكن القول أنّ إنزيم بلمرة الدنأ I هو إنزيم ذو نشاط مزدوج (d u a l) ،أى يُبَلمِر ويُجَرّد الدنأ فى ذات الوقت.

(ب) لقد وُجِد أنّ أنشطة البلمرة والتجريد الخاصة بإنزيم بلمرة الدنأ ــ I تقع تحت سيطرة مقاطع مختلفة من جزىء الانزيم . ويمكن فصل هذه الانشطة من بعضها إذا شُطِر الانزيم بطريقة معينة (الشكل ١٣ــ ٤ج). ويسمى مقطع الانزيم الذى يحتفظ بالقدرة على عملية البلمرة باسم "شظية كليناو Klenow fragment" . وعندما تفتقد شظية كليناو نشاطها النيوكلييزى ،فإنّها يمكنها أنْ تُخَلّق خيطا تكامليا مفردا من الدنأ على قالب مفرد الخيط. وينحصر الاستخدام الرئيسى لهذا الانزيم فى تحديد تتابعات الدنأ DNA-sequencing.

(ج) والطراز الثالث من انزيمات بلمرة الدنأ ــ والذى له أهمية كبرى فى تقنيات الهندسة الوراثية ،هو إنزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase ،ويستخلص هذا الانزيم من الخلايا المصابة بفيروس أورام الجروج ،وهو يتدخل فى عملية تناسخ replication العديد من الفيروسات . ويتميز إنزيم النسخ العكسى بخاصية فريدة unique ،

شكل (١٣ـ٤) : التفاعلات التى تتم بمساعدة إنزيمات بلمرة الـ د ن أ •

(أ) التفاعل الأساسى : خيط د ن أ جديد يخلق فى الاتجاه 5' ← 3'

(ب) انزيم بلمرة د ن أ I وهو بداية يملأ الشقوق لكنه بعد ذلك يستمر فى تخليق خيط جديد مجردا الموجود كلما تقدم •

(جـ) شظية كلينا و والتى تملأ فى الشقوق فقط •

(د) إنزيم النســخ العكســى والذى يستعمــل قالـــب مـــن الـــرن أ •

حيث وُجد أنّ له قالباً من الرنأ وليس من الدنأ . وقدرة هذا الانزيم على تخليق خيط تكاملي من الدنأ على قالب من الرنأ ، تعتبر نقطة جوهرية في تكنيك استزراع الدنأ التكاملي cDNA - cloning (الشكل ١٣–٤د) .

(٤) الانزيمات المحورة للدنأ : DNA Modifying Enzymes

يوجد العديد من الانزيمات التي يمكنها تحوير جزيئات الدنأ عن طريق إضافة أو استبعاد مجموعات كيميائية محددة ، وأهم هذه الانزيمات هي :

(أ) إنزيم الفوسفاتيز القلوى Alkaline phosphatase:

ويستخلص هذا الانزيم من بكتريا القولون (إ . كولاى) أو من نسيج أمعاء العجول . ويقوم هذا الانزيم باستبعاد مجموعة الفوسفات الموجودة عند الطرف 5' (5'- terminus) من جزئ الدنأ (الشكل : ١٣–٥أ).

(ب) إنزيم البولى نيوكلوتيد كينيز Polynucleotide kinase :

ويستخلص هذا الانزيم من بكتريا القولون المصابة بالفاج T4 وهذا الانزيم له تأثير عكسى لتأثير إنزيم الفوسفاتيز القلوى ، حيث يقوم بإضافة مجموعات فوسفات للأطراف 5' الحرة free 5'-termini (الشكل : ١٣–٥ب)

(جـ) إنزيم الدى أوكسى نيوكلوتيديل ترانسفريز الطرفى :

Terminal deoxynucleotidyl transferase

ويستخلص هذا الانزيم من نسيج الغدة التيموسية للعجول . ويقوم هذا الانزيم بإضافة واحدة أو أكثر من نوتيدات الدى أوكسى على الطرف 3' (3'- terminus) لجزئ دنأ (الشكل : ١٣– ٥جـ) .

(٥) إنزيمات التوبو أيزوميريز (إنزيمات فك الحلزنة) Topoisomerase:

وهذه هى المجموعة الأخيرة من الانزيمات التى تتعامل مع الدنأ ، وكما

(a) Alkaline phosphatase

(أ) إنزيم الفوسفاتير القلــــوى

(b) Polynucleotide kinase

(ب) إنزيم كينيـــــز متعددة النوتيدات

(c) Terminal deoxynucleotidyl kinase

(جـ) إنزيم الكينيز الطرفـــــى

(i)

(ii)

شكل (١٣–٥) : التفاعلات التى تتم بمساعدة الانزيمات المحورة للدنا
(أ) إنزيم الفوسفاتيز القلوى الذى يستبعد مجموعات الفوسفات فى الطرف 5' .
(ب) إنزيم الكينيز الذى يوصل مجموعات الفوسفات الى الطرف 5' .
(جـ) انزيم الترانسفريز الطرفى الذى يوصل نوتيدات الى الطرف 3' إما فى الجزيئات المفردة أو المزدوجـــــة .

سبق أن ذكرنا ، فهذه الانزيمات يمكنها تغيير الشكل الخاص بالدنأ المغلق تساهميا على شكل دوائر (مثل دنأ البلازميدات) بواسطة استحداث أو إزالة الحلزنة الفوقية له . ورغم أهمية هذه المجوعة فى دراسة تناسخ الدنأ ، إلا أنه اتضح إمكانية استعمالها فى مجال الهندسة الوراثية .

إنزيمات التحديد Restriction Enzymes

(الانزيمات المتخصصة فى تقطيع الدنأ Enzymes for cutting DNA)

تتطلب عمليات الاستزراع الجينى - كإحدى تقنيات الهندسة الوراثية - تقطيع جزيئات الدنأ بطريقة غاية فى الدقة والتحديد . وتشمل عمليات القَطْع كُلاً من الدنأ الخاص بالناقل Vector الذى سيقوم بنقل المقطع الجينى المرغوب ، وكذلك الدنأ الخاص بالخلية الواهبة . ويجب أن يُقْطَع جزئ الدنأ الخاص بالناقل فى موقع واحد لفتح الدائرة حتى يمكن إيلاج الدنأ الجديد . ويجب ملاحظة أنّ قطع جزئ الدنأ الدائرى للناقل فى أكثر من موقع ، سوف يترتب عليه تقطيع هذا الجزئ إلى اثنتين أو أكثر من الشظايا ، ويصبح غير ذى فائدة كمُوَجِّه vector استزراع . وعلاوة على ذلك يجب أن يُقْطَع كل جزئ ناقل عند نفس الموقع بالضبط على الدائرة ، لأنّ القطع العشوائى للجزيئات الدائرية للناقل لايعطى نتائج مُرْضية . ويتطلب ذلك نوعا خاصا جدا من إنزيمات النيوكلييز . كما أنه من الضرورى أيضا تقطيع الدنأ المرغوب استزراعه . ويوجد سببان لذلك هما :

الأول : إذا كان الهدف استزراع جين واحد فقط قد يتكون من ٢ أو ٣ كيلو/زوج/قاعدة (kbp) ، عندئذ يجب أن يُقْطَع هذا الجين من جزئ دنأ كبير (غالبا أكثر من ٨٠ كيلو قاعدة) باستعمال تكنيكات استخلاص الدنأ .

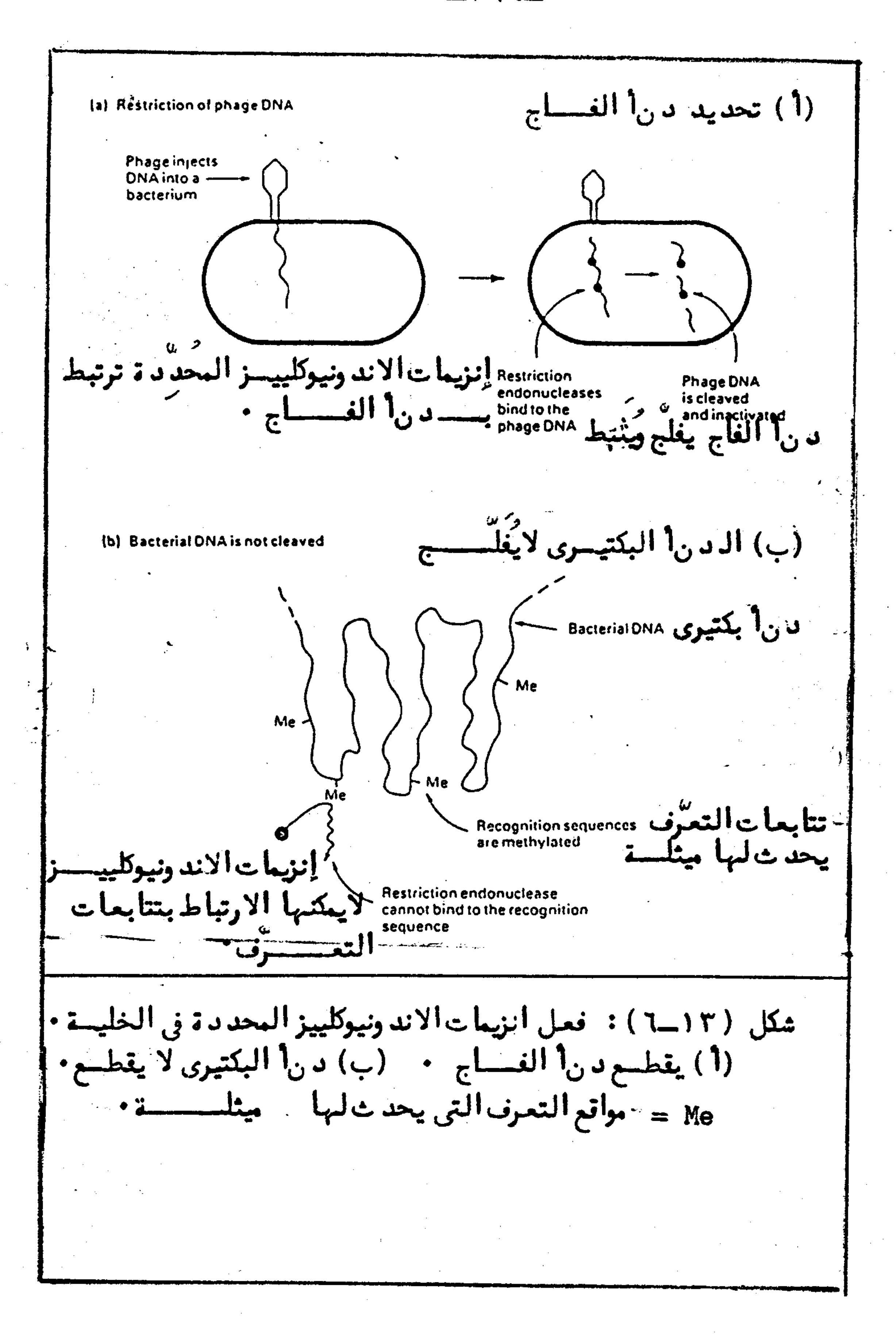
الثانى : إذا كانت جزيئات الـ د ن أ كبيرة فتقطع إلى شظايا صغيرة يمكن حملها بواسطة المُوَجِّه الناقل . ومعظم مُوَجِّهات الاستزراع الناجحة يمكنها حمل شظايا د ن أ تقع فى مجال مُحَدَّد من الحجم . فعلى سبيل المثال ، تكون الناقلات المعتمدة على الفاج M13 غير كفوءة لاستزراع جزيئات د ن أ أكثر من ٣ كيلو قاعدة فى الطول .

وتسمح إنزيمات القطع المتخصصة للمهندس الوراثى بتقطيع جزيئات الـ د ن أ فى الأماكن المحددة بالضبط والمطلوبة للاستزراع الجينى . ويعتبر هذا الاكتشاف المثير ، والذى نال من أجله علماء الوراثة "أربر W. Arber وسميث H. Smith وناثان D. Nathan جائزة نوبل عام ١٩٧٨ ، من الاكتشافات التى دفعت بحوث الهندسة الوراثية إلى الأمام .

لمحة تاريخية عن الاكتشاف وتحديد وظائف إنزيمات القطع المتخصصة :

كانت الملاحظة الأولى التى أدت إلى اكتشاف إنزيمات الاندونيوكلييز المتخصصة فى تقطيع الـ د ن أ فى خلال حقبة الخمسينيات من هذا القرن . فقد لوحظ أنّ بعض السلالات من البكتريا تُظْهِرُ مناعة للعدوى بالبكتريوفاجات ، وأُطلِق على هذه الظاهرة "التقييد المُحَدَّد بالعائل / host-controlled restriction".

وميكانيكية التقييد restriction هذه ، ليست مُعَقَّدة بدرجة كبيرة ، بالرغم من أنها استغرقت أكثر من ٢٠ عاما لتفهمها بالكامل . ويحدث التقييد لأنّ البكتريم ينتج إنزيما يُجَرِّد د ن أ الفاج قبل أن يتوفّر له الوقت اللازم للتناسخ وتوجيه تخليق جسيمات الفاج الجديدة (الشكل ١٣- ٦ أ ، ب) . ود ن أ البكتريم والذى يترتب على إتلافه الموت ، تتم وقايته من مهاجمة الفاج له بسبب أنه يحمل مجموعات ميثيل إضافية يمكنها وقف التأثير التجريدى للانزيم ، وتسمى هذه الانزيمات المجردة بانزيمات الاندونيوكلييز القاطعة restriction endonucleases .



شكل (١٣ــ٦) : فعل انزيمات الاندونيوكلييز المحددة فى الخليـة ٠
(أ) يقطـع د ن أ الفـــاج ٠ (ب) د ن أ البكتيرى لا يقطـع ٠
Me = مواقع التعرف التى يحدث لها ميثلـــــة ٠

وهى تُخلق بواسطة العديد -إن لم يكن جميع أنواع البكتريات. وقد تم حتى الآن توصيف أكثر من ٥٠٠ إنزيم منها . وقد أمكن التعرف على ثلاث مجموعات من هذه الانزيمات ،كل واحدة منها تُميّز عن الأخرى بواسطة اختلاف بسيط فى طريقة عملها . فالطرازان I و III من هذه الانزيمات معقدان ويلعبان دورا محدودا جدا فى تقنيات الهندسة الوراثية . أما الطراز II من هذه الانزيمات -فعلى العكس مما سبق-فانه يشمل إنزيمات القطع ذات الأهمية القصوى فى الإستزراع الجينى .

الطراز II من إنزيمات الاندونيوكلييز المتخصصة فى تقطيع cutting الد ن أ عند تتابعات نوتيدية محددة :

الخاصية المميزة لانزيمات القطع المتخصصة Restriction enzymes من الطراز II هى أنّ كل إنزيم له تتابع محدد يَتعرّف عليه specific sequence (بالندروم Pallindrome) ويقطع عنده جزىء الد ن أ. فكل إنزيم من هذه الانزيمات سوف يُفلّج جزيئات من الد ن أ عند تتابع مُتعرّف عليه وليس عند غيره . فعلى سبيل المثال ،إنزيم القطع المتخصص المسمى <u>PvuI</u> (والمعزول من البكتريم <u>Proteus</u> <u>vulgaris</u>) يقطع الد ن أ فقط عند التتابع النوتيدى السداسى hexanucleotide CGATCG . وعلى النقيض ،فقد تم عزل إنزيم ثان من نفس النوع البكتيرى يسمى <u>Pvu II</u> يمكنه قطع تتابع نوتيدى سداسى مختلف هو CAGCTG .

ويمكن للعديد من إنزيمات القطع المتخصصة أن تتعرّف على مواقع أهداف target sites سداسية النوتيدات ،ولكن هناك من هذه الانزيمات ما يمكنه أن يقطع عند مناطق تَعرُّف ذات تتابعات نوتيدية رباعية أو خماسية . ومن أمثلة ذلك الانزيم المسمى <u>Sau 3A</u> (والمعزول من البكتريم

Staphylococcus aureus strain 3A وهو يتعرّف على التابع GATC
والانزيم Alu I (والمعزول من البكتريم Arthrobacter luteus)
يتعرّف على التابع AGGT ويقطع عنده . وتوجد أمثلة أُخَر لانزيمات
القطع المتخصصة ذات تتبعات تَعَرُّف مَرِنَة degenerate ، بمعنى أنهـا
تقطع الد ن أ عند أى موقع من عائلة مواقع تَعَرُّف واحدة ذات قرابة . فعلـى
سبيل المثال الانزيم Hinf I (المستخلص من بكتريا Haemophilus
influenzae strain R يتعرّف على التابع (GANTC) وكذلـك
التتابعات : GAATC و GATTC و GAGTC
و (GATCT) .

ومبين فى الجدول (١٣ـ ١) تتابعات القَطْع لبعـض
الانزيمات كثيرة الاستعمال فى مجال الهندسة الوراثيـة .

ويوضح المثال التالى فِعْل إنزيم الاندونيوكليز المُحَدِّد EcoRI المستخلص
من بكتريا القولون E. coli (إ . كولاى) . ويقوم هذا الانزيم بفصم روابط الإستر
التساهمية بالقرب من طرفى البالندروم السداسى (تتابع نوتيدى معكوس مكوّن
من ٦ أزواج من النوتيدات) بعد التعرّف عليه ، كما يتضح من الرسم التالى :

```
                    موقـع التعـرف
           ↓
5'... NNNNGAA   |   TTCNNNN... 3'        محـور التماثـل
                ←———————————————
3'... NNNNCTT   |   AAGNNNN... 5'
                       ↑
```

ويلاحظ أن التتابعات النوتيدية داخل البالندروم لها نفس القراءة فى كـلا
الاتجاهين 3' ⟵ 5' من خيطى الد ن أ حول محور التماثل . ويشير السهمان
العلوى والسفلى إلى أماكن فصم الروابط التساهمية ، كما تمثل الحـروف N
نوتيدات غير محددة .

وتؤدى عملية كسر التتابع المستهدف داخل البالندروم إلى تكويـن

نهايتين متكاملتين من خيوط الد ن أ المفردة ،طول كل منها ٤ نوتيدات وتسمى كل واحدة منها بالنهاية اللزجة (sticky end) :

5'.... NNNG AATTCNNN ....3'

3'.... NNNCTTAA GNNN ....5'

وتسلك بعض إنزيمات التحديد المتخصصة الأخرى سُبلاً أخرى من التعرّف والقطع ،فمثلا إنزيم التحديد Hind II لايميّز ما بين البريميدينات المختلفة أو البيورينات المختلفة في مواقع محددة من الد ن أ ،ومن ثم فهو يقطع عشوائيا . كما أنّ بعض إنزيمات التحديد المتخصصة جدا ،مثل الانزيمين Alu I و Hae III يمكنها التعرف على بالندرومات غاية في الصغر تبلغ أربع نوتيدات ،وتعطى شظايا د ن أ ذات نهايات خشنة blunt ends (وليست لزجة sticky -انظر الجدول ١٣-١) .

وهذا التنوّع الواسع في أنشطة إنزيمات التحديد المتخصصة ،يساعد في قطع جزيئات الد ن أ من جميع الانواع إلى شظايا مُتنوّعة الشكل والطول ،ويتوقف ذلك على نوعية الانزيم أو الانزيمات المستعملة . كما أنّ شظايا الد ن أ من مصادر مختلفة ،والتي تتكون بواسطة أيّ إنزيم يمكنها بعد ذلك أن تلْحَم مع بعضها في توافيق مختلفة ، مكونة ما يسمى بجزيئات الد ن أ المطعمة Recombinant DNA molecules(DNA chimera) ،وهذه الجزيئات هي أساس مايسمى بالهندسة الوراثية .

وسوف نتناول في الباب ١٤ التقنيات المختلفة المستعملة في وصل ولحام جزيئات الد ن أ ، وكذلك كيفية تحريك هذه الجزيئات المُطَعَّمة وإدخالها في كائنات ميكروبية وكيفية تعبيرها عن ذاتها تحت مايسمى "تكنولوجيا الجينات Gene Technology".

جدول (١٣–١) : بعض إنزيمات القطع المتخصصة وتتابعات التعرّف الخاصة بها فى الدنا ، وهى من الانزيمات التى يكثر استعمالها فى مجال الهندسة الوراثية .

نوعية الاطراف	تتابعات التعرف	الكائن المستخلص منه	الانزيم
لزجة	GAATTC	Escherichia coli	EcoRI
"	GGATCC	Bacillus amyloliquefaciens	BamHI
"	AGATCT	Bacillus globigii	BglII
"	CGATCG	Proteus vulgaris	PvuI
خشنة	CAGCTG	Proteus vulgaris	PvuII
لزجة	AAGCTT	Haemophilus influenzaeR_d	HindIII
"	GANTC	Haemophilus influenzaeR_f	HinfI
"	GATC	Staphylococcus aureus	Sau3A
خشنة	AGCT	Arthrobacter luteus	AluI
لزجة	TCGA	Thermus aquaticus	TaqI
خشنة	GGCC	Haemophilus aegyptius	HaeIII

(*) التتابع المبين يختص بخيط واحد فى الاتجاه 5'→3'

لاحظ أن معظم تتابعات التعرف هى بالندرومات palindromes وعندما نأخذ فى الاعتبار كلا الخيطين فانهما يقرآن بنفس المعنى من كل اتجاه مثـــلا :

```
        5' G A A T T C 3'
EcoRI :    | | | | | |
        3' C T T A A G 5'
```

الاطراف الخشنة والاطراف اللزجـــة : Blunt ends&sticky ends

تعتبر الطبيعة الدقيقة للقطعات التى تنتج من إنزيم قطع بينى (إنزيم تحديد) (إند ونيوكلييز restriction endonuclease) ذات أهمية كبرى فى تصميم أى تجربة استزراع جينى . والكثير من إنزيمات القطع البينية يُحـدِث قطعات مزدوجة الخيط بسيطة فى منتصف التتابعات التى تتعرف عليها (الشكل ١٣-٧) . مما يؤدى إلى تكوين نهايات خشنة (Blunt ends) . ويعتبر الانزيمات PvuII و AluI من الامثلة التى تعطى قطعات خشنـة .

ويوجد عدد كبير نسبيا من إنزيمات الاند ونيوكلييز يمكنها قطع الدنا بطريقة مختلفة بعض الشئ . وباستعمال هذه الانزيمات لايُقْطَع خيطى الـدنا بالضبط عند نفس الموضع . وبدلا من ذلك يكون التَفلّج متمايــلا staggered عادة باثنتين أو أربع من النوتيدات ، ومن ثمّ فإنّ شظايا الدنا الناتجة يكـون لها نتوءات قصيرة مفردة الخيط فى كل طرف (الشكل ١٣-٧) . وتسمى هذه بالاطراف اللزجة sticky ends وذلك لانّ تزاوج القواعد بينها يمكنـه أن يلصق جزئ الدنا مرة أخرى . وأحد الخصائص الهامة لانزيمات الاطراف اللزجة هى أن انزيمات القطع البينية التى لها تتابعات تعرّف recognition sites (بالندرومات) مختلفة قد يمكنها تكوين نفس الاطراف اللزجـــة . فالانزيم Bam HI (له تتابع تعرّف هو GGATCC) والانزيـم Bgl II (له تتابع تعرّف هو AGATCT) على سبيل المثال، كليهما يعطى أطرافاً لزجة GATC (الشكل ١٣-٧ جـ)) . وينتج نفس الطـرف اللّزج بواسطة الانزيم Sau 3A والذى يتعرّف فقط على التتابع النوتيدى الرباعى GATC. وشظايا الدنا المُنتَجة بواسطة التفلّج بأيٍّ من هذه الانزيمـات يمكن أن يوصل بعضها مع بعض ، حيث أن كل شظية سوف تحمل طرفا لزجـا تكامليا .

(a) Production of blunt ends

(أ) تكوين نهايات خشـــنة

·N·N·A·G·C·T·N·N· — AluI → ·N·N·A·G· C·T·N·N·
·N·N·T·C·G·A·N·N· ·N·N·T·C G·A·N·N·

'N' = A, G, C or T

Blunt ends
نهايات خشنـــة

(b) Production of sticky ends

(ب) تكوين نهايات لزجـــة

·N·N·G·A·A·T·T·C·N·N· — EcoRI → ·N·N·G A·A·T·T·C·N·N·
·N·N·C·T·T·A·A·G·N·N· ·N·N·C·T·T·A·A G·N·N·

Sticky ends
نهايات لزجـــة

(c) The same sticky ends produced by different restriction endonucleases

(ج) نفس النهايات اللزجة التي تنتج بواسطة إنزيمات إند ونيوكلييز محددة مختلفـــة

BamHI ·N·N·G G·A·T·C·C·N·N·
·N·N·C·C·T·A·G G·N·N·

BglII ·N·N·A G·A·T·C·T·N·N·
·N·N·T·C·T·A·G A·N·N·

Sau3A N·N·N G·A·T·C·N·N·N·
N·N·N·C·T·A·G N·N·N·

شكل (١٣ـ٧) : النهايات المُنتَجة بواسطة تقطيع الد ن أ بإنزيمات إند ونيوكلييـــز محددة مختلفـــة :

(أ) نهاية خشنة منتجة بواسطة الانزيم Alu I .

(ب) نهاية لزجة منتجة بواسطة الانزيـــم EcoRI.

(ج) نفس النهايات اللزجة المنتجة بواسطة الانزيمات

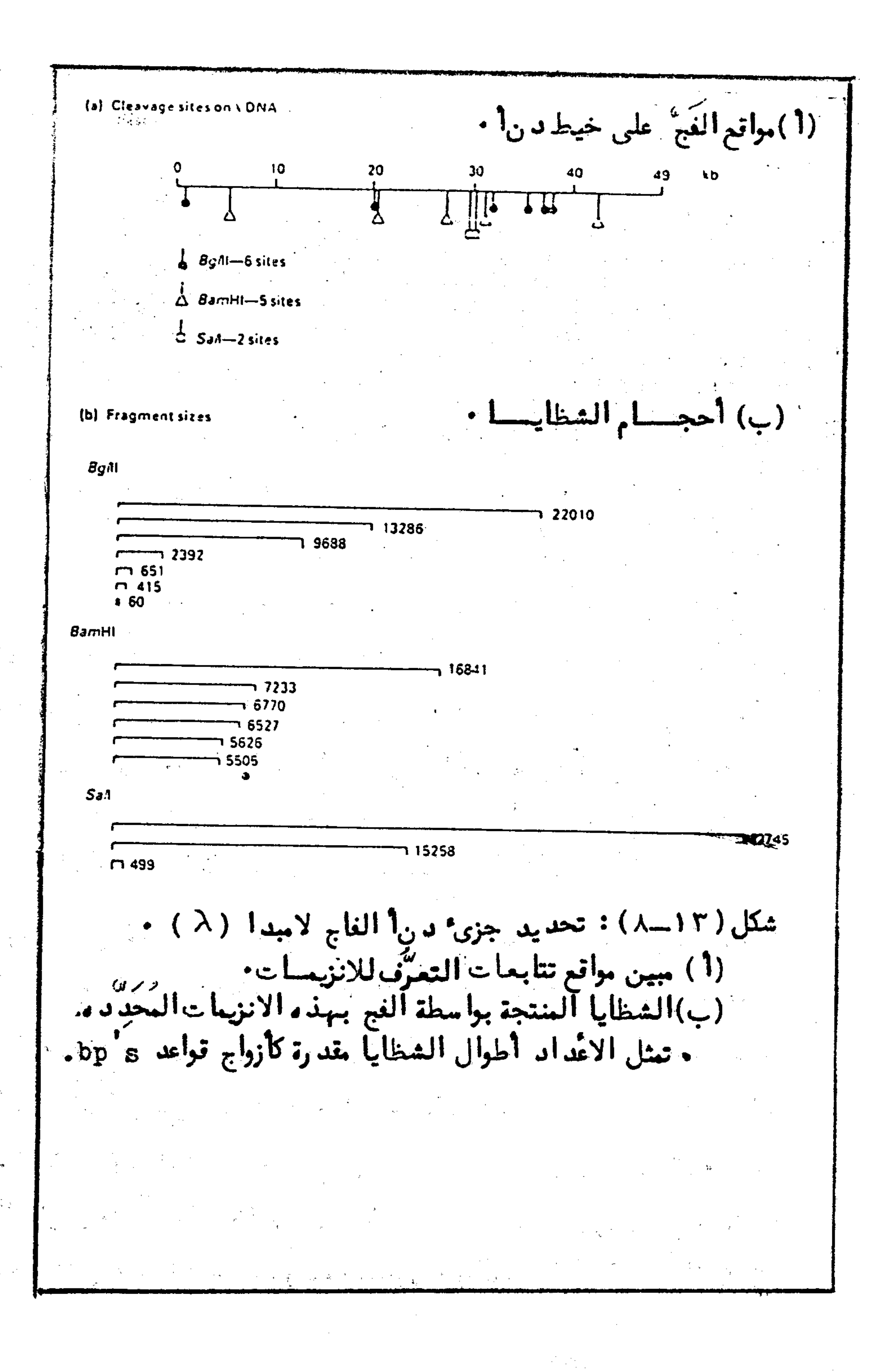
.Bam HI , Bgl II , Sau 3A

معدل تتابعات التعرف فى جزئ د ن أ :

Frequency of recognition sequences in a DNA molecule

يمكن حساب تتابعات التَعرّف لانزيم إند ونيوكلييز معين فى جزئ د ن أ ذى طول معروف ،بطريقة رياضية • فالتتابع النوتيدى الرباعى (مثلا GATC) يتكرر مرة واحدة كل $٤^٤$ = ٢٥٦ نوتيدة ،والتتابع النوتيدى السداسى (مثلا GGATCC) يتكرر مرة واحدة كل $٤^٦$ = ٤٠٩٦ نوتيدة •وتفترض هذه الحسابات أنّ النوتيدات مرتبة بطريقة عشوائية وأنّ النوتيدات الاربع المختلفة (الموجودة فى الد ن أ الطبيعى) تتواجد بنسب متساوية (أى أن محتوى GC = ٥٠ ٪) • ومن الناحية العملية ،فإنّ أياً من الافتراضين ليس صحيحا كلية • فعلى سبيل المثال جزئ د ن أ الفاج لامبدا (λ) ،بطول ٤٩ كيلو/قاعدة يجب أن يحتوى على حوالى ١٢ موقعا لانزيم قطع بينى له تتابع تَعرُّف سداسى النوتيدات• ولكن فى الحقيقة تحدث مواقع التعرّف هذه بمعدل أقل (على سبيل المثال ٦ لـ Bgl II و٥ لـ Bam HI و ٢ لـ Sal I) ،وهذا انعكاس لحقيقة أن محتوى الـ GC فى الفاج لامبدا أقل من ٥٠ ٪ من الد ن أ الكلى له (أنظر الباب الثانى ـ الشكل ٢ ـ ٢٤) •

وعلاوة على ذلك ،فان مواقع التعرف ـ عادة ـ ليست موزعة بطريقة منتظمة على طول جزئ الد ن أ • فلوكانت هذه المواقع منتظمة التوزيع ،لامكن للهضم بواسطة إنزيم قطع بينى معين أن يعطى شظايا من الد ن أ ذات أحجام شبه متساوية تقريبا • ويبين الشكل (١٣ـ٨) الشظايا الناتجة من تقطيع د ن أ الفاج لامبدا (λ) بواسطة إنزيمات القطع Bgl II و Bam HI و Sal I ويظهر من الشكل وجود امتداد واضح فى أحجام الشظايا ،مما يشير إلى أنّ النوتيدات فى د ن أ الفاج لامبدا ليست عشوائية التنظيم • والدرس المستفاد من الشكل



شكل (١٣ــ٨) : تحديد جزيء د ن أ الفاج لامبدا (λ) .

(أ) مبين مواقع تتابعات التعرف للانزيمــات .

(ب) الشظايا المنتجة بواسطة الفج بهذه الانزيمات المحددة .

. تمثل الأعداد أطوال الشظايا مقدرة كأزواج قواعد bp's .

(١٣ـ٨) هو أنه بالرغم من أنّ الأساليب الرياضية قد تُعطى فكرة عن عدد مواقع التعرّف التى يمكن توقع وجودها فى جزىء ما من الـ د ن أ ، إلاأنّ التحليل التجريبى هو الذى يمكنه أن يُظهر الصورة الحقيقيـــــة .

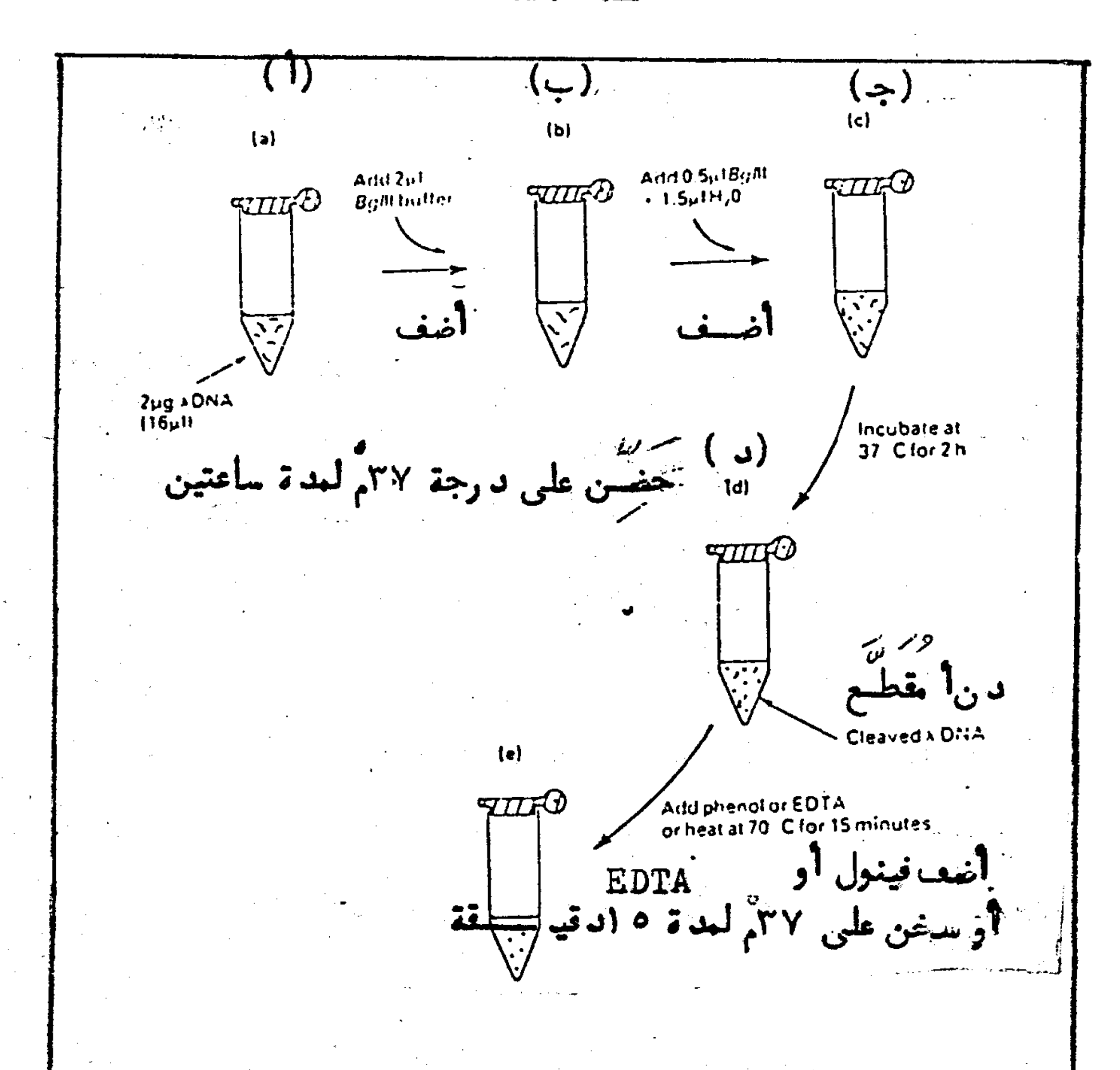
كيفية اجراء عملية هضم تقطيعى للد ن أ فى المخـــتبر :

Performing a restriction digest in the laboratory

كمثال سوف نتناول طريقة هضم عينة من د ن أ الفاج لامبدا (بتركيز ١٢٥ ملليجرام /ملليلتر) باستخدام إنزيم القطع البينى Bgl II.

أولا : تنقل كمية الـ د ن أ المطلوبة إلى أنبوبة اختبار بواسطة ماصة خاصـــة . وتتوقف كمية الـ د ن أ المراد تقطيعها على طبيعة التجربة المراد اجراؤهـــا . وفى حالتنا هذه نفترض أننا سوف نهضم ٢ ملليجرام من د ن أ الفاج لامبــــدا موجودة فى ١٦ مل (ml)من العينة . ويتطلب ذلك استعمال ماصات دقيقـــة للغاية (الشكل ١٣ـ٩) .

ثانيا : المكون الثانى الأساسى الآخر فى التفاعل هو إنزيم القطع البينى المتخصص restriction endonuclease ، وهذا يمكن الحصول عليه من مُمَوّرِّد تجارى كمحلول نقى معروف التركيز . ولكن قبل إضافة الانزيم يجب ضبط المحلول المحتوى على الـ د ن أ لتوفير الظروف الصحيحة لقيام الانزيم بأقصى نشاط لـــه . ويلاحظ أنّ معظم إنزيمات القطع البينية تؤدى وظيفتها على أتم وجه عند درجة تركيز أيون هيدروجين (pH) قدرها ٧٫٤ ، لكن تختلف الانزيمات المختلفـــة فى متطلباتها من القوة الأيونية -ionic strength- (وهذه توفّر عادة بكلوريد الصوديوم NaCl) وتركيز المغنسيوم Mg^{2+} (جميع إنزيمات القطـــع البينية من الطراز II تتطلب توافر أيون المغنسيوم لتؤدى وظيفتها) . كذلك ينصح بإضافة عامل اختزال (a reducing agent) مثل مادة الداى ثيـــو ثرايتول (dithiothreitol) وهى تُثبِّت نشاط الانزيم وتمنع تثبيطـــه .



شكل (١٣ــ٩) : الخطوات العملية لاجراء تجربة هضم تقطيعـى لجزيئات د ن أ فى المختبر باستعمال إنزيمات الاندونيوكلييـز المحددة ــ للتفاصيل أنظر الموضوع تحت العنوان الخـاص بـه .

وتَوَفُّر الظروف المناسبة لنشاط الانزيم ذو أهمية قصوى لنجاح الهدف، لذلك يلاحظ أنّ تركيزات كلوريد الصوديوم وأيونات المغنسيوم غير الصحيحة لايؤدى فقط لإنقاص نشاط إنزيم القطع البينى ، لكنها قد تسبب أيضا تغيرات فى خاصية الانزيم ، لذلك يحدث تقلّج للدنأ فى مناطق تتابعات تعرُّف إضافية غير نموذجية .

ثالثا : تجهيز المحلول المُنَظِّم المناسب Suitable Buffer:

فى الجدول (١٣ ـ ٢) مبين تركيب المحلول المُنظِّم المناسب للانزيم BglII لذلك يخفف بإضافته إلى مخلوط التفاعل . وفى مثالنا الحالى يكون الحجم النهائى المناسب لمخلوط التفاعل هو ٢٠ ميكرولتر (ml) ، لذلك يجب أن نضيف ٢ ميكرولتر من المحلول المُنظِّم 10X BglII buffer لـ ١٦ ميكرولتر من الدنأ الموجودة فعلا (الشكل ١٣ ـ ٩) .

جدول (١٣ ـ ٢) : محلول منظم ١٠ X مناسب لتقطيع دنأ بواسطة الانزيم Bgl II.

المكون	التركيز
Tris-Hcl, pH 7.4	500 mM
$MgCl_2$	100 mM
NaCl	500 mM
Dithiothreitol	10 mM

والآنّ يمكن إضافة إنزيم القطع البينى ، ومن المتفق عليه أنّ وحدة واحدة

من الانزيم تعرّف بأنها الكمية المطلوبة لقطع واحد ميكروجرام من الد ن أ في خلال ساعة واحدة ،لذلك -يلزم في مثالنا الحالي وحدتان من إنزيم ال BglII لتقطيع ٢ ميكروجرام من د ن أ الفاج لامبدا (λ) . وغالبا مايمكن الحصول على هذا الانزيم بتركيزات ٤ وحدات لكل ميكرولتر (4 units/ml) ،لذلك فإنّ ٥و٠ ميكرولستر تكون كافية لتجزئة الد ن أ . وفي النهاية تكون عناصر مخلوط التفاعل هي : 0.5ml BglII+1.5ml water .

رابعا : التحضين : Incubation

تعتبر درجة حرارة التحضين هي العنصر النهائي الذي يجب أنْ يؤخذ في الاعتبار في عملية الهضم التقطيعي للد ن أ . ومن المعروف أنّ معظم الانزيمات البينية تقوم بعملها على أحسن وجه على درجة حرارة ٣٧ْم ،لكن القليل منها له متطلبات مختلفة . فعلى سبيل المثال الانزيم Taq I (وهو يستخلص من بكتريم يسمى (Thermus aquaticus) يعيش عند درجات حرارة مرتفعة جدا في بيئات مماثلة لفصول الربيع الحارة . لذلك فانّ عمليات الهضم التقطيعي (restriction digests) بواسطة الانزيم Taq I يجب أنْ تحضّن على درجة حرارة ٦٥ْم للحصول على أقصى نشاط له .

خامسا : التخلص من الانزيم بعد انتهاء الهضم :

بعد مرور ساعة ،يفترض أنّ عملية التقطيع تكون قد تمت . فاذا كانت شظايا الد ن أ الناتجة بواسطة عملية الهضم التقطيعي سوف تستعمل في تجارب استزراع ،ففي هذه الحالة يجب اتلاف الانزيم حتى لايقوم بهضم جزيئات الد ن أ الاخرى التي قد تضاف فيمابعد . وتوجد عدة طرق "لقتل" الانزيم وفي كثير من الاحيان يكفي التحضين على درجة حرارة ٧٠ْم لفترة قصيرة ،وفي أحيان أخر يتم الاستخلاص بواسطة الفينول أو بإضافة مادة ال E D T A

(وهى تربط أيونات المغنسيوم Mg^{2+} ولذلك يُمنع تأثير إنزيم القطــــع البيـــنى) .

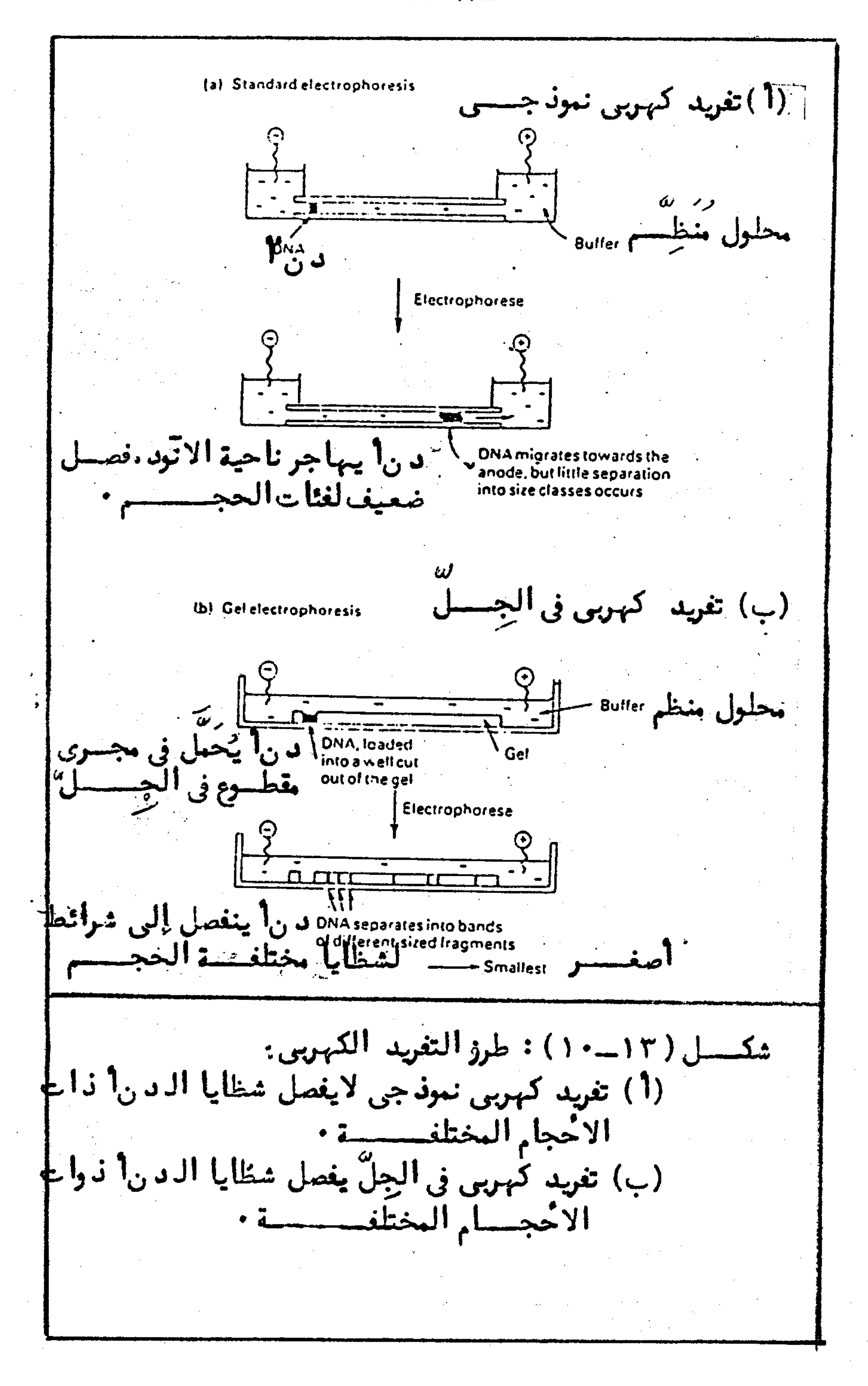
طريقـة تحليل عملية الهضم التقطيعى بانزيم إند ونيوكلييز مُحَدِّد :

يترتب على عملية هضم جزئ د ن أ بواسطة إنزيم إند ونيوكلييز مُحَدِّد تكوّن عدد من شظايا الد ن أ ،يتوقف حجم كل منها على مواقع تتابعات التعــرف R.sites الخاصة بالانزيم فى الجزئ الاساسى (الشكل ١٣ــ٨) . ومن الواضح أنـــه لابد من وجود وسيلة لتحديد عدد وأحجام شظايا الد ن أ الناتجة إذا كـــان لهذا الانزيم أنْ يُستَعمل فى الاستزراع الجينى . ولاختبار ماإذا كان جزئ د ن أ قد تم تقطيعه أم لا بواسطة إنزيم مُحَدِّد يجرى اختبار لزوجة Viscosity للمحول . وتكون المحاليل المحتوية على جزيئات د ن أ كبيرة الحجم أكثر لزوجة من المحاليل المحتوية على جزيئات أصغر فى الحجم . وفى البداية كان حســـاب وتحديد عدد وأحجام شظايا الد ن أ الناتجة من الهضم الانزيمى عملية صعبة للغاية ،ولكن فى بداية حقبة السبعينات من هذا القرن أمكن التغلب على هـــذه المشكلة بعد اكتشاف تكنيك التحليل الكـــهربى فى الجلّ Gel electrophorese. ويمكن تلخيص خطوات التحليل فى النقاط التاليـــة :

(١) فصل الجزيئات بواسطة التفريد الكهربى فى الجلّ :

Separation of molecules by gel electrophoresis

جزيئات الد ن أ و البروتينات وغيرها من المركبات البيولوجية الأخـــــر ، تحمل شحنة كهربية ،لكنها سالبة فى حالة الد ن أ . وبناء على ذلك ،فعنـــدما توضع جزيئات الد ن أ فى مجال كهربى فإنّها سوف تُهاجر ناحية القطب الموجب (الشكل ١٣ــ١٠) . ويتوقف مُعدّل هجرة أى جزئ على عاملين هما شكله وشُحنته



شكل (١٣ـ١٠) : طرق التغريد الكهربى:

(أ) تغريد كهربى نموذجى لايفصل شظايا الد ن أ ذات الأحجام المختلفة .

(ب) تغريد كهربى فى الجل يفصل شظايا الد ن أ ذوات الأحجام المختلفة .

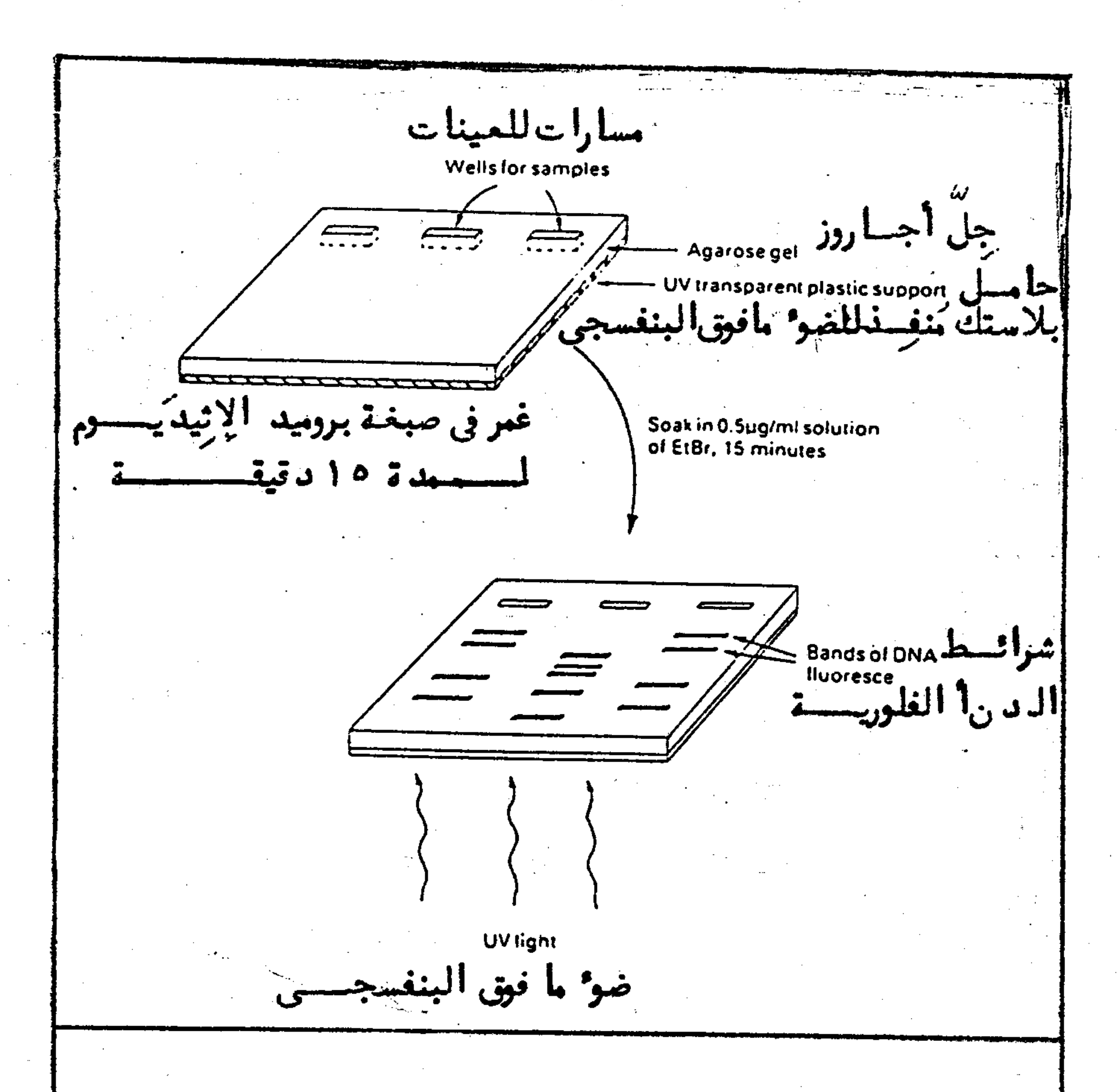
الكهربية • ولسوء الحظ فإنّ معظم جزيئات الد ن أ لها نفس الشكل، وجميعها يحمل شحنات كهربية متماثلة جدا ، ولذلك فإنّ الشظايا ذوات الأحجام المختلفة لايمكن فصلها بالتفريد الكهربى النموذجى Standard electroph

وبالرغم مما سبق ، فإنّ حجم جزيئات الد ن أ يصبح ذا أهمية لو أجرى التفريد الكهربى فى الجِلّ • وجِلّ مُكوّن عادة من أجاروز agarose أو بولى أكريل أمايد Polyacrylamide أو من خليط منهما يحتوى على شبكة معقدة من الثقوب من خلالها تتحرك جزيئات الد ن أ لتصل الى القطب الموجب positive electrode وكلما كانت جزيئات الد ن أ أصغر كلما كانت أسرع فى الهجرة خلال الجِلّ • وبناء على ذلك فإنّ التفريد الكهربى فى الجِلّ سوف يفصل جزيئات الد ن أ طبقا لحجمها (الشكل ١٣ـ١٠ب) •

ومن الناحية العملية فإنّ تركيب الجِلّ هوالذى يُحَدِّد أحجام جزيئات الد ن أ التى يمكن فصلها • فشريحة slab سمكها ٥و٠سم مكونة من ٣و٪ أجاروز تكون ذات ثقوب كبيرة نسبيا يمكن استعمالها لجزيئات تتراوح فى الحجم مابين ٥ إلى ٦٠ كيلو/قاعدة (Kb) ، مما يسمح لها ،على سبيل المثال ،من تمييز جزيئات بأطوال من ٣٠ إلى ٣٥ كيلو/قاعدة بمنتهى الوضوح • ومن ناحية أخرى فإنّ جِلّ ٤٠٪ من البولى أكريل أمايد الرقيق جدا (سمك ٣و٠ملليمتر) يكون ذا ثقوب صغيرة جدا ، يمكن استعماله لفصل جزيئات د ن أ أصغر فى الحجم تتراوح مابين ١ إلى ٣٠٠ زوج قولعد (Kbp) ، ويمكنه التمييز مابين جزيئات قد تختلف فى الطول فى نوتيدة واحدة •

(٢) استبيان جزيئات الد ن أ فى الجِلّ : Visualizing DNA molecules

(أ) الصبغ Staining : أسهل طريقة لرؤية نتائج عملية التفريد الكهربى فى الجِلّ هى صبغه بمركب يجعل الد ن أ مرئيا visible وتستعمل صبغة "بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide (EtBr)" لتوضيح



شكل (١٣-١١) : توضيح شرائط الد ن أ فى جلّ للاجاروز بالصبغ بصبغة بروميد الايثيديوم (EtBr) والأشعة ما فوق البنفسجية - حيث تظهر الشرائط الفلورية براقة .

الد نأ فى محلول مُتدرّج من كلوريد السيزيوم (CsCl) فى جل الاجّاروز أو البولى أكرايل أمايد (الشكل ١٣-١١) . وتكون الشرائط التى تبيّن مواقـــع الفئات ذات الاحجام المختلفة من شظايا الد نأ مرئية بمنتهى الوضوح تحـــت الاضاءة بالاشعة مافوق البنفسجية UV-light بعد الصبغ ببروميـــــد الإثيديوم طالما توفرت كمية كافية من الد نأ فى كل شريط band.

(ب) التصوير الاشعاعى الذاتى للد نأ الموسوم إشعاعيـا :

Autoradiography of radicactively-labelled DNA

إنّ أحد عيوب الصبغ ببروميد الاثيديوم هو وجود حدٍّ معين لحساسيتـه، فلاتظهر الشرائط المصبوغة بهذه الصبغة اذا كانت كمية الد نأ فى الشريــط الواحد one band فى الجل أقل من ٢٥ نانوجرام (ng) . ولادراك وجود الكميات الصغيرة جدا من الد نأ يتطلب الامر استعمال طريقة عاليـــة الحساسية ولقد وجد أنّ التصوير الاشعاعى الذاتى هو أنسب الطرق . فـــاذا وُسِم الد نأ -قبل التفريد الكهربى- بدمج واسم نشط إشعاعيـــا (radioactive) فى الجزيئات الفردية ،ففى هذه الحالة يمكن استيضاح الد نأ بوضع فليم تصوير حساس للاشعة السينية (X-rays) فـــوق الجلّ . وفى هذه الحالة نجد أن الد نأ الموسوم إشعاعيا سوف يترك خطوطا سوداء على الفيلم تحدد طراز الشرائط الالكتروفوريـــــة .

أسئلة وتمارين :

(١) أذكر أسماء ثلاثة من العلماء المشهورين أدت أبحاثهم الى تطوير الفكـر الوراثى الذى قاد الى عصر الهندسة الوراثية . اشرح باختصار بعضا من تجاربهـــم .

(٢) ماالمقصود بكل من المطلحات العلمية التاليــة :

أ ـ البالندروم Pallindrome.

ب ـ النهايات الخشنة والنهايات اللزجة Blunt and sticky ends.

جـ شظيـة كلينـاو Klenow's fragment.

(٣) أذكر لمحة تاريخية عن اكتشاف وتحديد وظائف إنزيمات الاندونيوكلييـز المُحدِّدَة ، مع ذكر بعض الأمثلة منها والتى لها أهمية فى مجالات الهندسة الوراثيــة .

(٤) تلعب إنزيمات الأحماض النووية أدواراً هامة فى عملية إلتئام الدنأ ـ اشـرح هذه العبارة مع ذكر بعض الانزيمات والدور الذى يقوم به كل منهـا .

(٥) اذكر تجربة عملية لتقطيع جزيئات الدنأ فى المختبر ، ثم وضِّح كيفيـة إجراء تحليل لشظايا الدنأ الناتجـة .

الباب الرابع عشر

أسس الهندسة الوراثية وتكنولوجيا الجينات

Principles of Genetic Engineering and Gene Technology

مقدمة :

فى أواخر السبعينات من هذا القرن دخل علم الوراثة مجالا جديدا من خلال واحدا من أكثر الاكتشافات المثيرة فى البيولوجيا الجزيئية ،وهو مايسمى بتكنولوجيا الدنأ المطعم .Recombinant DNA tech أو الهندسة الوراثية .Genet.Engineer ،وذلك لتخليق صور جديدة للحياة novel life forms لاتتواجد فى الطبيعة • ومما لاشك فيه أنّ هذه الاكتشافات سوف تستمر فى تطوراتها المثيرة فى جميع علوم الحياة فى المستقبل القريب والبعيد • ويشمل هذا المجال من المعالجة الجينية G.manipulation عددا من التقنيات التى تُمكِّن من الحصول على توليفات جديدة من المادة الوراثية مركبة بطرق اصطناعية داخل المختبرات عن طريق التحكم فى تنظيم تتابعات نوتيدية من الأحماض النووية • وتعتبر التجارب التى أجراها كل من شانج وكوهين عام ١٩٧٣ من المحاولات الرائدة فى هذا المجال (أنظر البلازميدات وكَلْونَة - استزراع - الدنأ صفحة ١٦٦ ،الباب الرابع) • ومن خلال هذه التقنيات أصبح فى الامكان نقل جينات من نوع معين من الكائنات إلى نوع آخر مختلف عنه كلية متخطين بذلك حواجز الانْواع • فعلى سبيل المثال يمكن نقل جينات من كائنات ثديية Mammals إلى خلايا بكتيرية ،مما يجعل هذه الميكروبات تصبح وكأنها مصانع حيوية دقيقة لتصنيع (وبكميات كبيرة نسبيا) بروتينات ذات أهمية اقتصادية وطبية عظيمة ،مثل الهرمونات (كالانسولين وهرمون النمو) ،وبروتينات الانترفيرون interferons (البروتينات الليمفاوية التى تمنع تناسخ أنواع كثيرة جدا من الفيروسات) • وهذه البروتينات تنتج بكميات ضئيلة جدا فى الآدميين لدرجة

أنّ تكاليف استخلاصها وتنقيتها من الانسجة يصبح مُكلِفاً جداً مما يحـــد د لد رجة كبيرة استعمالها الطبى فى الوقاية وعلاج الامراض ،لكن بواسطة الهند سة الوراثية أصبح فى الامكان إنتاج مُخْتَلَف مواد تجلّط الدم والبروتينات المكملـــة (وهى جزء من نظام المناعة) ،و مواد أخرى لعلاج أمراض النقص الوراثيـــة (Euphenics).

وفى عام ١٩٨٠ قررت المحكمة العليا (فى الولايات المتحدة) أنّ صُوَر الحياة الجديدة التى تُخَلّق بواسطة تكنولوجيا الهندسة الوراثية يمكن أن تنـال براءات اختراع . وأصبحت تكنولوجيا الهندسة الوراثية الآن مجالا واسعـــا للاستثمار بواسطة المؤسسات الخاصة ــ لانتاج تراكيب وراثية جديدة ذات فائدة. فمثلا ،لقد قامت إحدى الشركات بتخليق ميكروب يمكنه أن يُحلّل زيت البترول ، و من ثم قد يُسْتَعمل هذا المخلوق الجديد فى التنظيف البيولوجى للزيـــوت المتدفقة التى تلوث البيئـــة .

وتجرى حاليا محاولات مكثفة لاستخدام تكنولوجيا الهندسة الوراثية فـــى نقل جينات تثبيت النيتروجين الجوى إلى محاصيل غير بقولية (كمحاصيل الحبوب مثلا) مما يُمَكّن هذه النباتات من أن تصبح وراثيا "ذاتية التسميد" من مصدر النيتروجين غير المحدد الموجود فى الجـــو .

والامثلة القليلة التى عُرِضت تكفى لتوضيح الامكانيات الهائلة لهـــذه التكنولوجيا الحيوية الجديدة ،كما أنها توضح السبب فى الاثارة الضخمة الـتى سيطرت على الأوساط العلمية والاقتصادية فى جميع أنحاء العالم فيما يختـص بالامكانيات المثيرة التى يحتمل تحقيقها فى المستقبل القريب من خلال هـــذه التكنولوجيا لرفاهيـــة الجنس البشـــرى .

وفى هذه التقنيات ،تقوم الناقلات Vectors ،مثل البلازميدات أو الفيروسات بحمل مقاطع من الدنا المرغوب نقله إلى خلايا مضيفة host cells حيـــث

يمكنها التكاثر والتزايد amplification بأعداد كبيرة • وتسمح هـذه العملية بإمكان عزل نُسَخ عديدة من المادة الوراثية (جين أو جينات) وتحديد تتابعاتها sequencing من القواعد ،وكذلك في حالات متنوعة ، إمكانية نَسْخها transcriping في صورة م•رنأ mRNA ،ثم تُتَرْجم بعد ذلك إلى بروتين •

مضمون الاستزراع الجيني :

كما سبق أن ذكرنا فقد نشأ الاستزراع الجيني (gene cloning) أو ما يسمى "كلونة الجينات" في منتصف حقبة السبعينات من هذا القرن ،عندما أصبح في الامكان تقطيع الدنأ ونقل مقاطع معينة منه ،تحتوي على أجزاء محددة من المعلومات الوراثية ،من نوع معين من الكائنات إلى نوع آخر مختلف تماما • ونتيجة لذلك فإنّ خصائص الكائن المستقبل (Recepient) لهذا الدنأ الغريب تتغير بطريقة محددة • فعندما يكون الكائن المُستَقْبِل ميكروبا ـ مثلا بكتريم وحيد الخلية ـ فإنّ المقطع المُحَدَّد من الدنأ المنقول يتكاثر عدة مرات كلما تكاثر الميكروب المضيف host microbe ،ومن ثم تنتج منه عدة ملايين من الخلايا الصنوية (identical) ،وبمعنى أدق تنتج مزرعة خلوية (cell clone). وتوفر تقنيات العلوم الميكروبية الوسائل السهلة للحصول على مزرعة نقية (pure clone) من الخلايا البكتيرية • ويترتب على ذلك إمكانية الحصول على عدة ملايين من النُّسَخ الخاصة بجين ما أو بمجموعة من الجينات • ويعتبر الاستزراع الجيني أهم تقنيات الهندسة الوراثية والتي تتراوح استخداماتها مابين تشييد سلالات جديدة من النباتات والحيوانات والميكروبات إلى استبدال الجينات المعيبة (defective genes) في الآدميين الذين يعانون من الأمراض الوراثية •

الطريقة العامة لعملية الاستزراع الجينى :

The General Protocol for a Gene Cloning Procedure

يتطلب تفهم عملية الاستزراع الجينى نوعين من المعلومات هما :

أ ـ بعض المعلومات الخاصة بالبيولوجيا الجزيئية Molecular Biology وقد سبق عرض ذلك فى الباب الثالث عشر .

ب ـ بعض الخبرة العملية فى تداول الأجزة الحديثة والتكنيكات ، وهذه يمكن توفيرها بالتدريب المستمر فى المختبرات التى قطعت شوطا كبيرا فى مجالات البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية .

وسوف نعرض بعضا من هذه التكنيكات فى أجزاء لاحقة من هذا المرجع . وللمساعدة فى تصور العملية بطريقة مبسطة ، نعرض فى الشكل (١٤ـ١) تخطيطا مبسطا لها :

أولا : تشمل الخطوة الأولى فى بروتوكول الاستزراع الجينى تكسير جُدُر وأغلفة الخلايا الحية . وتوجد طرق عديدة لإجراء ذلك ، أشهرها هى رَجّ sheering الخلايا فى خلاط Blender ، ثم معاملتها بمحلول مُطَهِّر detergent (الخطوة ١ فى الشكل (١٤ـ ١) .

ثانيا : تشمل الخطوة الثانية فصل المادة الوراثية من الخلايا . ويمكن إجراء ذلك بطريقة مباشرة وسهلة ، حيث يتم فصل الدنا بواسطة الطرد المركزى الفوقى ultracentrifugation ولما كانت جزيئات الدنا أطول آلاف المرات من أى جزيئات كبيرة أُخَر فى الخلايا ، فقد تمكن العلماء من تشييد تقنيات عديدة لتنقية الدنا المستخلص من هذه الخلايا . وأحد هذه التقنيات المستعملة هو لف spooling هذه

الجزيئات على قضيب من الزجاج ،ثم بعد ذلك يُنْزَع القضيب الزجاجى الحامل لجزيئات الد نا من محلول الخلايا المكسرة •

ثالثا : تشمل الخطوة الثالثة (رقم ٣ و٤ فى الشكل ١٤ــ ١) قَطْع مقطع الجين (أو الجينات) المحدد المرغوب وعزله عن بقية الد نا،ويتم ذلك باستخدام إنزيمات التحديد المتخصصة • ولتصوّر ذلك يمكن اعتبار هذه العملية مشابهة لعملية تجهيز فيلم سينمائى متحرك • فالد نا مُقَسَّم إلى أُطُر frames كل منها ذى معنى عندما يُرَى فى الترتيب الصحيح • وتشير الأُطُر فى خيط الد نا إلى حروف الشِّفْرة الوراثية genet.code (أنظر الباب ١١) • وعندما ترتب مجموعة من الأُطُر أو الحروف الوراثية بتوليفة محددة ،فإنّها تُخَلِّق منظرا مشابها كما فى أى فيلم ،وهذه تماثل الجين فى حالة الد نا • وقد سبق أن عرضنا فى الباب ١٣ المقصات الجزيئية (إنزيمات التحديد Restriction enzymes)المستخدمة فى تقيطع الد نا الى مقاطع بأحجام الجينات•

رابعا : تشمل الخطوة الرابعة (رقم ٥ فى الشكل ١٤ــ ١) لصق splicing هذه المقاطع المحددة من الد نا (الجينات المرغوبة) فى وسائل استزراع (cloning vehicles)يمكنها حمل مقاطع الد نا إلى خلايا حية أخرى،ويتم ذلك فى وجود إنزيم اللحام (إنزيم الليجيز ligase.وتتكون وسائل الاستزراع من مقاطع صغيرة نسبيا من الد نا يمكنها اختراق جُدُر وأغشية الخلايا الحية المستضيفة host،كما يمكنها أيضا التكاثر داخل هذه الخلايا • وتشبه عملية لصق جين محدد فى وسيلة استزراع -إلى حد كبير ــعملية لصق منظر فى فيلم قصير • ويترتب على عملية اللصق هذه تكوين جزئ د نا كيميرى chimeric DNA، يشمل جزء منه وسيلة النقل Vectorويشمل الجزء الآخر الجين المطلوب تطعيمه •ويطلق على جزء الد نا فى حالته الجديدة اسم "جزئ الد نا

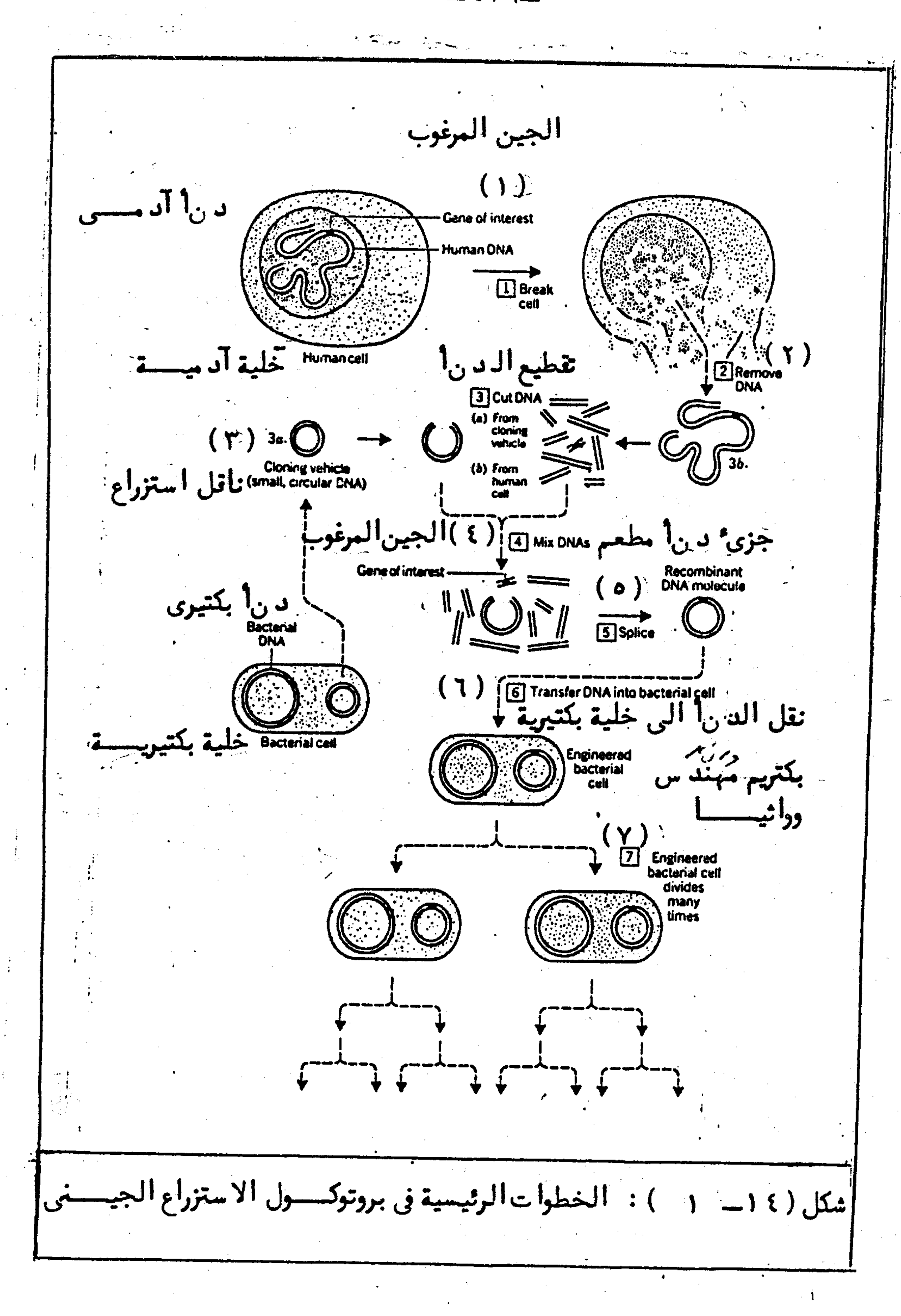
المُطَعَّم (recombinant DNA molecule)أو البلازميد المُطَعَّم Recombinant plasmid • ويمكن أن يكون الناقل vector بلازميداً plasmid أو فيروساً virus (أنظر وسائل نقل الجينات فى الهندسة الوراثية فى جزء لاحق من هذا الباب) •

خامسا : بمجرد ماأن تتم عملية لصق الجين المرغوب تطعيمه (جين آدمى ، حيوانى ،نباتى أو بكتيرى) فى وسيلة استزراع يجرى نقل الجزىء المطعم إلى خلية عادة مايكون فى مقدورها أن تستضيف هذا الجزىء، وغالبا ماتكون هذه الخلايا كائنات وحيدة الخلية كالبكتريات والخميرة (الخطوة ٦ فى الشكل ١٤ــ ١) ،أوقد تكون خلية حيوانية أو نباتية •

سادسا : تشمل الخطوة الأخيرة فى عملية الاستزراع الجينى جعل الخلية المستضيفة (host cell) تتكاثر باستمرار لتكوّن مُستَنبتا خلويا (clone) يحتوى على ملايين من الخلايا الصنوية • وفى المثال الموضح فى الخطوة رقم ٧ (الشكل ١٤ــ ١) • نجد أنّ كل فرد فى المُستنبَت الخلوى يحتوى ــبالإضافة إلى محتواه العادى من الـ د ن أ ــ نفس مقطع الـ د ن أ (الجين) المرغوب نقله والملتحم مع د ن أ الجزىء الناقل (vector) •

وبهذه الطريقة فإنّ جزءاً من المعلومات الوراثية الغريبة وهى الجين الآدمى أو الحيوانى أو النباتى أو البكتيرى يمكن نقله إلى خلية بطريقة اصطناعية • ومع التحفظ الشديد يمكن القول بأن كائنا جديدا قد خُلِق •

وبصورة عامة ليس الهدف من الاستزراع الجينى هو نقل المادة الوراثية الغريبة ــفى حد ذاتها ــمجرد عملية نقل دون فائدة ، فالمعلومات البيولوجية المُشَفَّرة فى الـ د ن أ يجب أنْ تُتَرجم إلى ناتج مفيد ،لذلك يجب أن



شكل (١٤ــ ١) : الخطوات الرئيسية فى بروتوكـــول الاستزراع الجيـــنى

تنتقل المعلومات من الجين إلى مواقع تخليق البروتين فى الخلية ،ويتطلب ذلك الإلمام بعملية تعبير الجين gene expression (أنظر الباب ١١) . و كمثال لذلك سوف نستعرض تخليق هرمون الانسولين الآدمى فى البكتريات.

تخليق هرمون الانسولين الآدمى فى البكتريات:

يعتبر هرمون الانسولين Insulin من البروتينات الهامة ، وهو يخدم كمثال جيد لاستعراض أحد تطبيقات تكنولوجيا الهندسة الوراثية لرفاهية الجنس البشرى . ومن الناحية الوراثية ،فإنّ جين الانسولين عبارة عن مقطع من الدنا الآدمى مُحَمّل شفريا بمعلومات بيولوجية لتخليق هرمون الانسولين . ومن المعروف أنّ بعضا من مرضى السكر Diabetics تفشل أجسادهم فى تخليق كميات كافية من الانسولين ،ومن ثم فهم غير قادرين على السيطرة السليمة على عملية أيض السكر sugar/metabolism فى أجسادهم ،ومن ثم يتطلب الأمر حقن هؤلاء المرضى يوميا بالانسولين . وقبل اكتشاف الكلونة (الزرع) الجينى ،كان الحصول على الانسولين يتم بطرق مكلفة وذلك باستخلاصه من بنكرياس الخنزير،ويلاحظ أنّ انسولين الخنزير ليس مطابقا تماما للانسولين الآدمى — كذلك الحال بالنسبة لانسولين البقر ،ولكن الآن من خلال عملية الكلونة الجينية أمكن تطعيم جين الانسولين الآدمى المفصول من دنا خلايا بنكرياس الانسان فى خلايا بكتيرية . وفى هذه الخلايا أمكن للجين الآدمى أنْ يُعَبِّر عن نفسه ،وأصبح فى الامكان تخليق الانسولين الآدمى فى الخلايا البكتيرية . وتنتج الآن كميات هائلة وعلى نطاق تجارى من الانسولين الآدمى داخل البكتريات. ويجب ملاحظة أنّ انتاج هذا الهرمون الآدمى عن طريق البكتريات المُهَنْدَسَة وراثيا أسهل بكثير من استخلاصه من نسيج البنكرياس، كما أنه أقل تكلفة ،علاوة على أنّ الخلايا البكتيرية المُهَنْدَسَة وراثيا تقوم

بتخليق الانسولين الآدمى الطبيعى النقى ،وهذه ميزة مهمة جدا لمرضى السكر الحساسين allergic لانسولين الخنزير .

وأخيرا يمكن تلخيص عملية الكلونة الجينية فى أربع نقاط رئيسية هى :

(١) فصل واستخلاص مقطع أو مقاطع الد نأ المرغوب نقلها .

(٢) وصل مقطع الد نأ فى ناقل وتكوين جزئ د نأ مطعم .

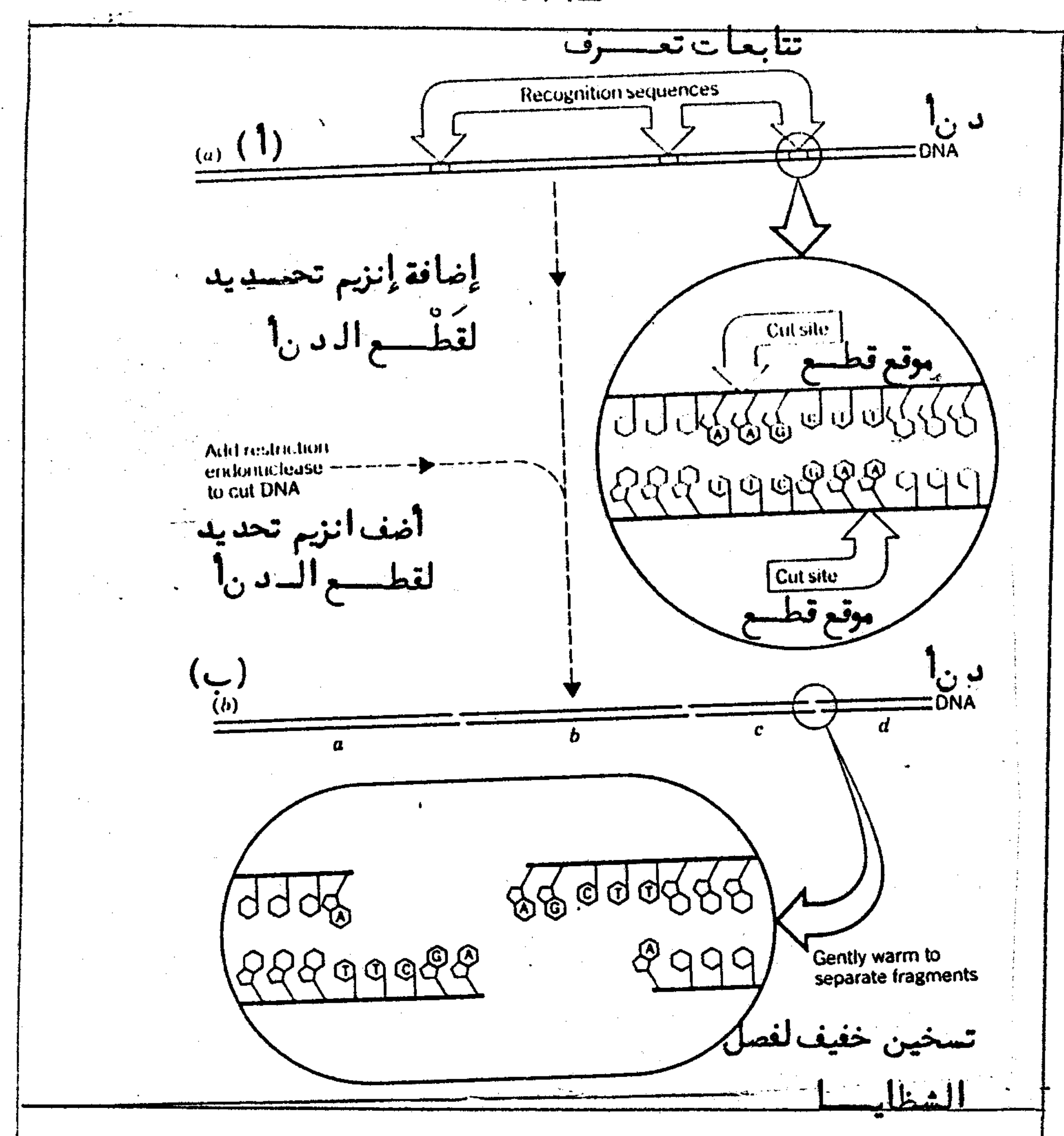
(٣) إدخال الناقل المُطَعَّم فى خلية يمكنه التناسخ فيها .

(٤) انتخاب الخلايا التى تحمل جزيئات الد نأ المطعم ثم إكثارها كمستنبت أو كلون (clone) .

المقصات البيولوجية : Biological scissors

كما سبق أن أوضحنا فى الباب (١٣) ،تشمل إنزيمات التحديد restric-tion endonucleases مجموعة من الانزيمات ينظر إليها على أنها مَقَصّات بيولوجية . ويمكن لهذه الانزيمات التعرّف على تتابعات نوتيدية مُحَدّدة فى الد نأ طولها غالبا مايكون أربعة أو سته أزواج من القواعد ،وهى تقطع كلا خيطى الد نأ داخل موقع التعرف recognition site (أو البالندروم pallindrome) وفى بعض الحالات لايُقطع خيطى الد نأ فى الاتجاهين العكسيين للمزدوج ، بل تكون القطعات متمايلة staggered . وفى الحالة المخططة فى الشكل (١٤ — ٢) تتباعد القطعات بواسطة أربع نوتيدات . وعندما تحدث القطعات كما فى هذا المثال ،فإنّ الأزواج الأربعة من القواعد هى التى تظل ماسكة لخيطى الد نأ مع بعضهما . وعندما يُسخّن الد نأ المقطوع تسخينا هادئا ،فان أزواج القواعد الأربعة سوف تنفصل عن بعضها ويتجزأ الد نأ إلى شظايا .

ومما هو معروف أنّ جزيئات الد نأ طويلة جدا وتحتوى على عدد كبير جدا من مواقع التعرف لمختلف إنزيمات التحديد والتى يمكن أن يحدث فيها القطع ،



شكل (١٤-٢) : تفلج الـ د ن أ بواسطة إنزيمات الاندونيوكلييز المُحَدِّدَة.

(أ) جزئ د ن أ ممثل بخطين متوازيين ، ويفترض أنه يحتوى التتابعــات النوتيدية التى يمكن أن تتعرف عليها إنزيمات التحديد.

(ب) عند إضافة إنزيم تحديد للـ د ن أ ، فانه يرتبط به ويقطعه حيث يمكــن أن تنتج بعض القطعات المتمايلة. فى المثال أعلاه يفترض تكون ٤ شظايــا قصيرة a , b , c , d كل منها ذات نهايات لزجة يمكنها أن تتــزاوج مع بعضهــا.

كما أنّ عمليات القطع واللصق قد يترتب عليها تكون كثير من التوافيق المختلفة مابين شظايا الـ د ن أ الملتصقة • وتُستَعمل الطرق الكيميحيوية ـ المبنية على أسس تزاوج القواعد التكاملي ـ لمعرفة وتحديد مكان أحد التوافيق المحددة والمتكونة من شظايا ملتصقة •

ويمكن تقطيع جزيئات الـ د ن أ إلى شظايا مختلفة الأطوال وذلك باستخدام عدد من إنزيمات التحديد المختلفة ،وتكون هذه الشظايا أصغر مما لو استعمل إنزيم تحديد واحد على حده • ومن الممكن مقارنة أماكن القطع لأحد الانزيمات بالنسبة لبعضها البعض ،وذلك بالمقارنة بأحجام شظايا الـ د ن أ الناتجة بالمعاملة بواسطة إنزيمين فى وقت متزامن ،مع أحجام شظايا الـ د ن أ الناتجة لكل إنزيم بمفرده • ويعطى هذا الطراز من التحليل الانزيمى ما يسمى "بخريطة التحديد Restriction map" وهى خاصية مميزة وفريدة لكل جزئ د ن أ يوضع تحت الدراسة •

ويلاحظ أنه عندما تحدث طفرة فى جزئ د ن أ عند موقع تأثير أحد إنزيمات القطع ،فانّ هذه الطفرة عادة ماتؤدى إلى منع هذا الانزيم من تأدية وظيفته عند هذا الموقع الطافر ،ويترتب على ذلك تولد شظية د ن أ كبيرة عندما يقطع الـ د ن أ الطافر • ولقد دخلت هذه النتيجة حيز التطبيق العملى لتقنيات الهندسة الوراثية • فمن الممكن الآن تشخيص بعض الأمراض الوراثية فى الأجنة الآدمية ،وذلك بتحليل أحجام مقاطع الـ د ن أ المنتجة بواسطة إنزيمات التحديد فى الـ د ن أ الآدمى •

لحام الـ د ن أ : DNA Ligation

كما سبق أن ذكرنا (الباب ١٣) تعطى إنزيمات الاندونيوكلييز المحددة قطعات متماثلة يطلق عليها "النهايات اللزجة sticky ends" • ويلاحظ

أن النوتيدات فى النهايات مفردة الخيط لشظايا الد نأ تكون تكاملية مع النهايات المتولدة لجزيئات آخر قُطِعَت بنفس إنزيم التحديد المستعمل • ومن ثم ، فعندما يتقابل جزيئان من الد نأ لهما نهايات تكاملية ، فإنّ الاطراف مفردة الخيط تتزاوج مع بعضها ويميل الجزيئان للالتصاق مع بعضهما (أنظر الرسم التخطيطى ـ الشكل ٤ ١ ـ ٣) ، ويتم ذلك فى وجود إنزيم الليجيز ، حيث أنّ وظيفته الاساسية هى لِحام جزيئات الد نأ مع بعضها عقب تناسخهما • فإذا كان هذا الانزيم متواجداً عندما يتقابل معا جزيئان من الد نأ لهما نهايات لزجة ، فإنّ هذا الانزيم سوف يُحدِث التئاماً للكسرات التى تسببت بواسطة إنزيمات الاندونيوكلييز المُحَدِّدَة • وبناء على ذلك فإنّ عملية اللصق يمكن إجراؤها ـ ببساطة ـ بواسطة خلط جزيئات د نأ ذوات نهايات لزجة تكاملية مع بعضها مع إضافة إنزيم ليجيز الد نأ • ولقد طُوِّر هذا التكنيك الآن بحيث أصبحت النهايات اللزجة غير ضرورية بعد اكتشاف إنزيم ليجيز يمكنه لحام النهايات الخشنة (blunt ends) للد نا • وهذا الانزيم مفيد جدا لوصل نهايات تتخلق بواسطة إنزيمات إندونيوكلييز لا تعطى نهايات لزجة •

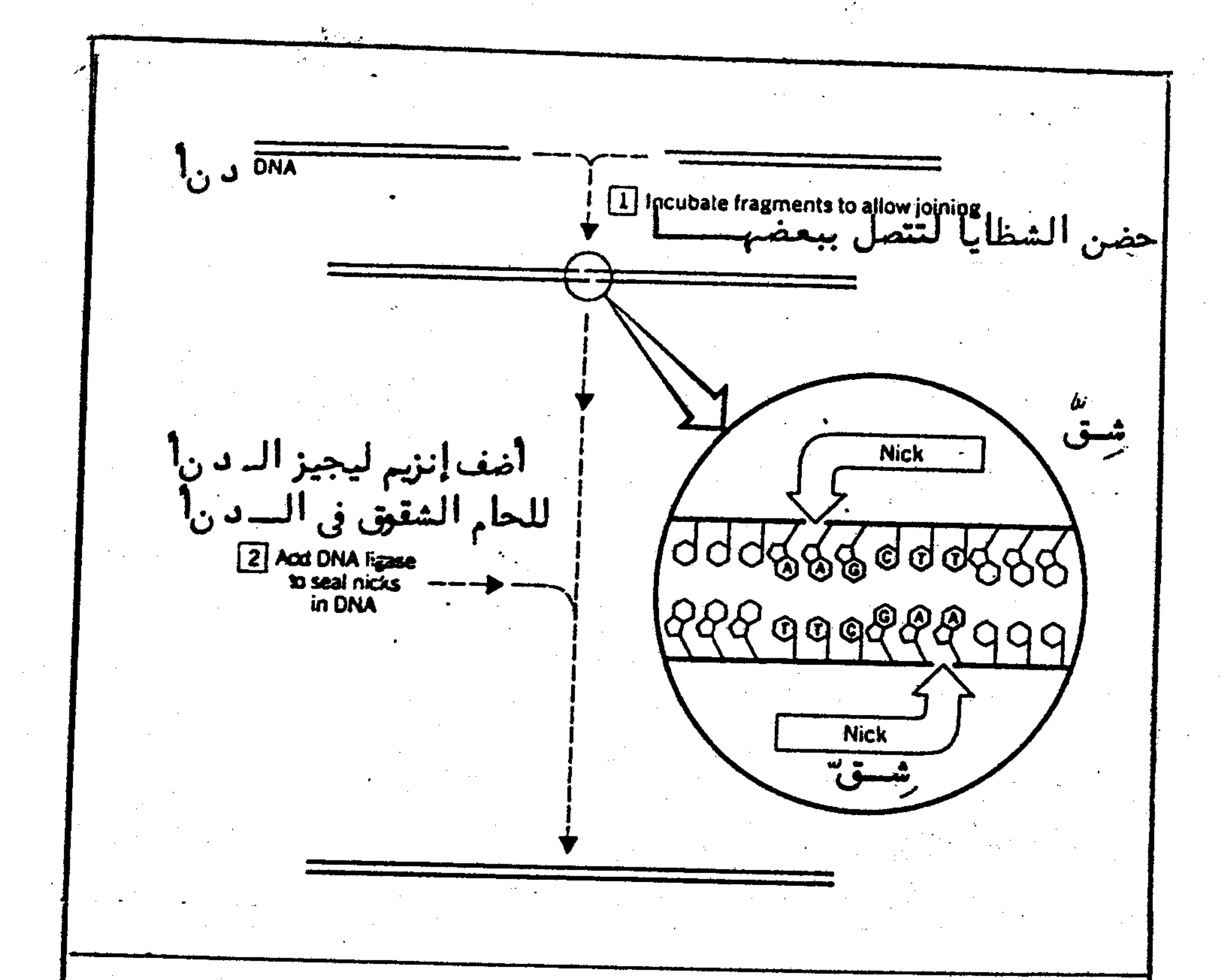
طرق وصل مقاطع الد نأ لتكوين جزيئات مطعمة :

Splicing DNA fragments to form recombinant molecules

توجد عدة طرق عامة للوصل يمكن استعمالها لتخليق جزيئات د نأ المطعمة لاستعمالها فى تقنيات الهندسة الوراثية :

(أ) الطريقة العشوائية : Shotgun Method

وهى تعتمد على الطريقة العامة للاستزراع الجينى ، وتتلخص فى النقاط التالية (أنظر الشكلين ٤ ١ ـ ٤ و ٤ ١ ـ ٥) :



شكل (٤١ـ٣) : عملية لحام شظيتين من الـ د ن أ مع بعضهمـــــا :

(١) يخلط معا جزيئات من الـ د ن أ لهما نهايات تكاملية لِزجة ثـــم يُحَضَّنان incubated • يتجمّع الجزيئات ثم تتكون أزواج القواعـــد •

(٢) تلتحم شقوق (nicks) الخيوط إنزيميا بواسطة ليجيـــز الـــ د ن أ •

دليل الشكل (١٤ـ٤) :

مخطط عام لتركيب جزيئات د ن أ مطعمة باستعمال بلازميدات وانزيمات قطع بيئية Restriction endonucleases:

(أ) ينتخب جزيء د ن أ غريب وناقل بلازميدى ـ كلاهما يحمل مواقع للتعرف يمكنها أن تُشَق بنفس إنزيم القطع البينى .

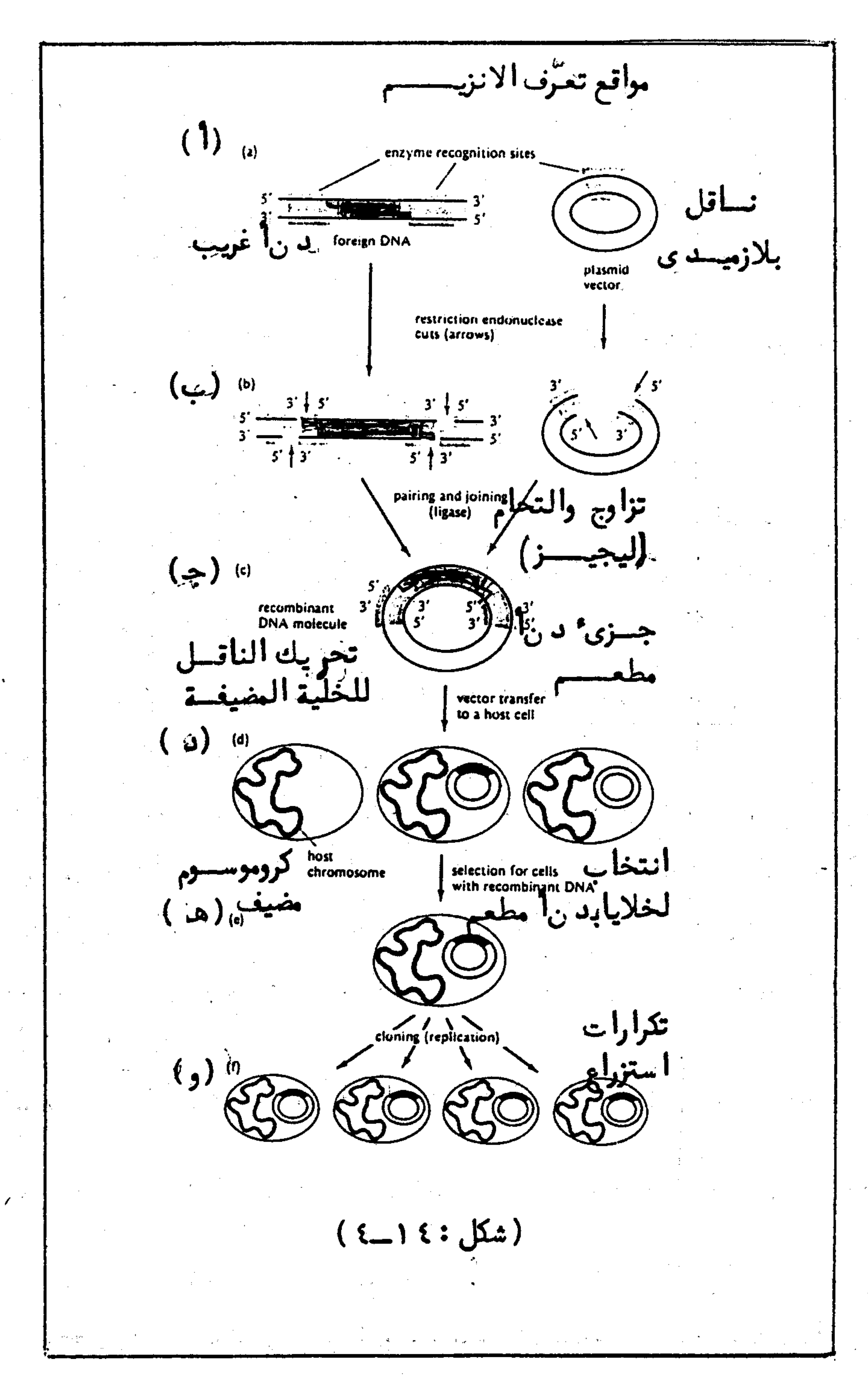
(ب) الشَّق ينتج شظية واحدة أو أكثر من الـ د ن أ الغريب ويفتح الناقل البلازميدى .

(جـ) القطعات المُنْتَجة بواسطة إنزيم القطع تكون متمايلة ويترتب على ذلك أن يحدث تزاوج متكامل للقواعد بين القطعات ذوات النهايات مفردة الخيط (اللزجة) لشظايا الـ د ن أ الغريب و د ن أ البلازميد المفتوح . وبعد ذلك فإنّ إنزيم لحام د ن أ يربط تساهميا كلا جزيئى الـ د ن أ فى صورة جزيء د ن أ مطعم . (ولمنع الناقل البلازميدى من إعادة إلتحام نهايتيه اللزجتين قبل أنْ يُوَصّل مع الـ د ن أ الغريب ، فانه كثيرا ما يُعَامل بانزيم الفوسفاتيز القلوى الذى يُثبِّط عملية اللحام وذلك بازالة الفوسفات عند كل فتحة قطع (٥َ) للناقل . كما أنّ جزيء الـ د ن أ الموهوب لا يعامل بمثل هذه الطريقة ، ومن ثم يسمح بالارتباط بين النهايات 5'-P والنهايات 3'- OH للناقل . ومن الواضح أنه بمجرد أن تتكون هذه الروابط فان تركيزات إضافية من إنزيم ليجيز الـ د ن أ يمكنها أن تسبب الترابط بين النهايات المترابطة (5' -OH و 3'-OH) .

(د) بعد ذلك يولج البلازميد الحامل للـ د ن أ الغريب فى خلية مضيفة .

(هـ) عملية انتخابية لعزل خلايا حاملة لجزيء الـ د ن أ المطعم .

(و) بعد ذلك كل عزلة من هذه العزلات يسمح لها بالتكاثر ـ ومن ثم مولدة لمستعمرة (كلون) حاملة لجزيء معين من شظية الـ د ن أ الغريب والتى أولجت فى الخطوة جـ .



مواقع تعرّف الانزيـــم
(أ) (a)
enzyme recognition sites
5' 3'
3' 5'
foreign DNA
د ن أ غريب
ناقل بلازميدى
plasmid vector
restriction endonuclease cuts (arrows)
(ب) (b)
pairing and joining (ligase)
تزاوج والتحام (اليجيز)
(ج) (c)
recombinant DNA molecule
جزئ د ن أ مطعم
تحريك الناقل للخلية المضيفة
vector transfer to a host cell
(د) (d)
host chromosome
كروموسوم مضيف
selection for cells with recombinant DNA
انتخاب لخلايا بد ن أ مطعم
(هـ) (e)
cloning (replication)
تكرارات استنزاع
(و) (f)

(شكل : ١٤ ـ ٤)

١- يعزل الد ن أ من الكائن الواهب ،ثم يُقَطّع إلى شظايا كثيرة بواسطة إنزيم قطع بينى متخصص مثل EcoRI ،كما يستعمل نفس الانزيم فى فصم الـــد ن أ الدائرى للبلازميد الذى يستعمل كناقل vector .

٢- يخلط نوعى شظايا الد ن أ (الكروموسومى والبلازميدى) معاً فى الأنبـــوب، ويسمح للنهايات اللزجة لكل منهما بالالتحام لتكوين دوائـــــر .

٣- يضاف إنزيم لحام الد ن أ (الليجيز DNA ligase) وذلك لِلحام النهايات المكســـــورة .

٤- تعامل خلايا البكتريات الخالية من البلازميدات بمحلول مخفف من كلوريـــد الكالسيوم لجعل جُدُرها أكثر نفاذية لالتقاط البلازميدات المطعمـــــة Recombinant plasmids.

ويمكن تمييز مستعمرات الخلايا الحاملة للبلازميد المطعم المرغـــوب فيه والتى يمكنها تخليق البروتين المطلوب بطرق إنزيمية وسيرولوجية . وقـــد يكون من المرغوب فيه أن يُزاوَج البروتين - المستزرع مادته الوراثية - مع بعض من البروتين المُخَلَّـق طبيعيا فى الخلية البكتيرية ،وذلك لامكان استخلاصهمـــا معا من بيئة الاستزراع . وقد يحتاج البروتين الهجين أنْ يعامل إنزيميـــا لفصل البروتين المرغوب فيه والمُخَلَّق من الجين المستزرع ،من البروتين الطبيعى الحامـــل لــــه .

٥- تشمل الخطوة النهائية عزل وتنقية ثم اختبار البروتين المطلوب للنشاط الحيوى .

ب- <u>طريقة وصل شظايا الد ن أ الخشنـــة :</u> Splicing blunt ends

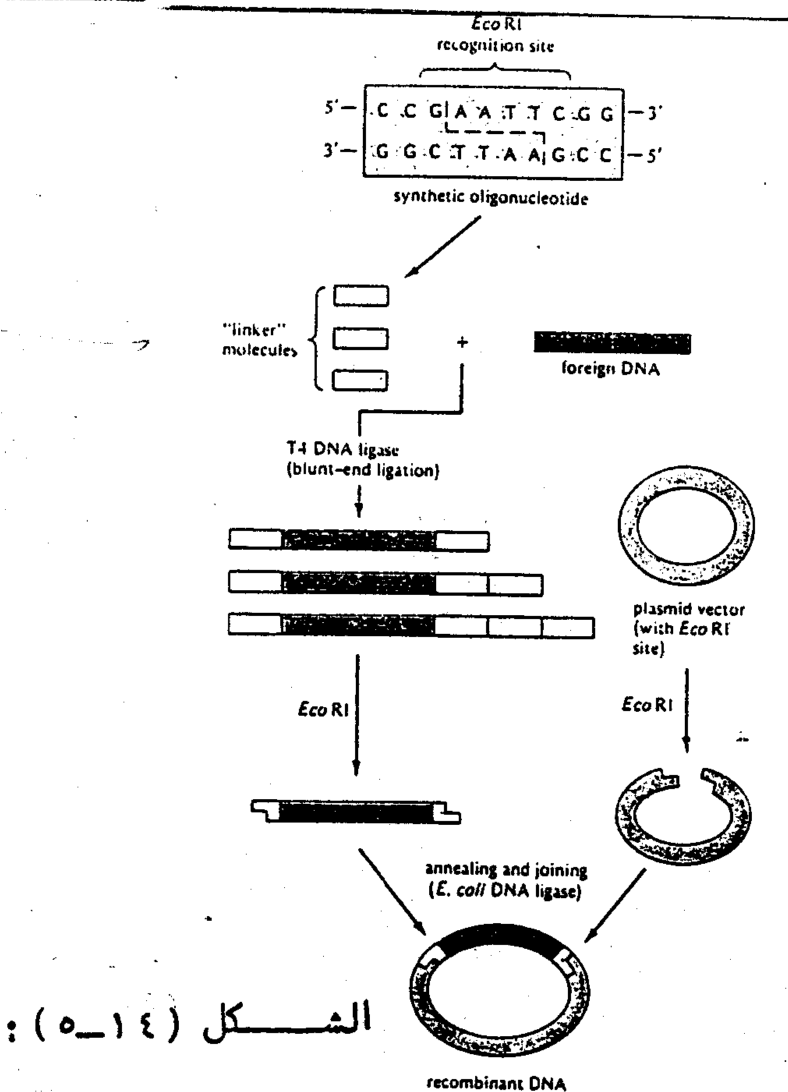
تعتمد طريقة الوصل هذه على حقيقة أنّ بعض إنزيمات لحام الـــــد ن أ (DNA ligases) مثل إنزيم ليجيز الفاج T4 يمكنه أن يُوَصِّل شظايا بأطراف خشنة . وبناء على ذلك فإنّ شظية من د ن أ غريب قد توصل بمقطع من نوتيدات قليلة مُخَلَّقة بطريقة اصطناعية بتتابع مرسوم . وكما هو موضح تخطيطيا فــــى

الشكل (١٤ ـ ٥) لوأنّ هذه الجزيئات الرابطة تحتوى على مواقع تعرف لانزيمات إند ونيوكلييز مُحَدّدة ،فإنّ الدنأ الغريب يمكن أن يُولَج فى ناقل بلازميدى ، بالرغم من أن الدنأ الغريب لايحتوى من البداية على مواقع تتعرف عليها أية إنزيمات مُحَدّدة موجودة فى البلازميد ٠

جـ ـ طريقة الوصل باستخدام إنزيمات النقل الطرفية :

Splicing by terminal transferases

تعتمد هذه الطريقة (الشكل ١٤ ـ ٦) على توفر إنزيمات نقل طرفية t. transferases ،يمكنها إضافة تتابعات بنفس النوتيدات (بوليمرات متجانسة homopolymers للنهاية 3' لسلسلة دنأ ٠ وفى هذا التكنيك نجد أنّ طرازا واحدا من الدنأ يحمل نهايات ٣َ ـ هيدروكسى مكشوفة ـ ناتجة إما بواسطة إنزيمات قطع طرفية exonucleases أوغيرها ـ يُحَضّن مع إنزيم نقل طرفى ومستودع من طراز واحد من النوتيدات ،على سبيل المثال dGtp. وفى نفس الوقت يعامل دنأ من مصدر آخر نفس المعاملة ،لكن بمستودع من نوتيدات تكاملية ،على سبيل المثال dCtp، ومن ثم ،فان نهايات ٣َ ببوليميرات متجانسة تكاملية ..GGGG3'/3'CCCC. تتولّد فى كلا طرازى الدنأ ،مما يسمح لهما بالالتئام anneal ،وبعد ذلك يمكن للالتحام أن يحدث بين طرازى الدنأ ليكوّنا جزىء دنأ المطعم ٠ وكما هو مصور فى الشكل (١٤ ـ ٦) ،فإنّ احدى ميزات استعمال أذيال tails التجمع النوتيدى (polydC) أو التجمع النوتيدى (polyd G)هو لو أنّ إنزيم قاطع مثل <u>Pst I</u> أو <u>Hae II</u>) استعمل لتوليد نهايات مكشوفة فى الناقل ،فإنّ الدنأ الغريب المُولَج يمكن فيما بعد أن يُستأصل تماما من الناقل باستعمال نفس الانزيم القاطع ،كما أنّ مصادر شظايا الدنأ الغريب التى



الشـــــكل (١٤ـ٥) :

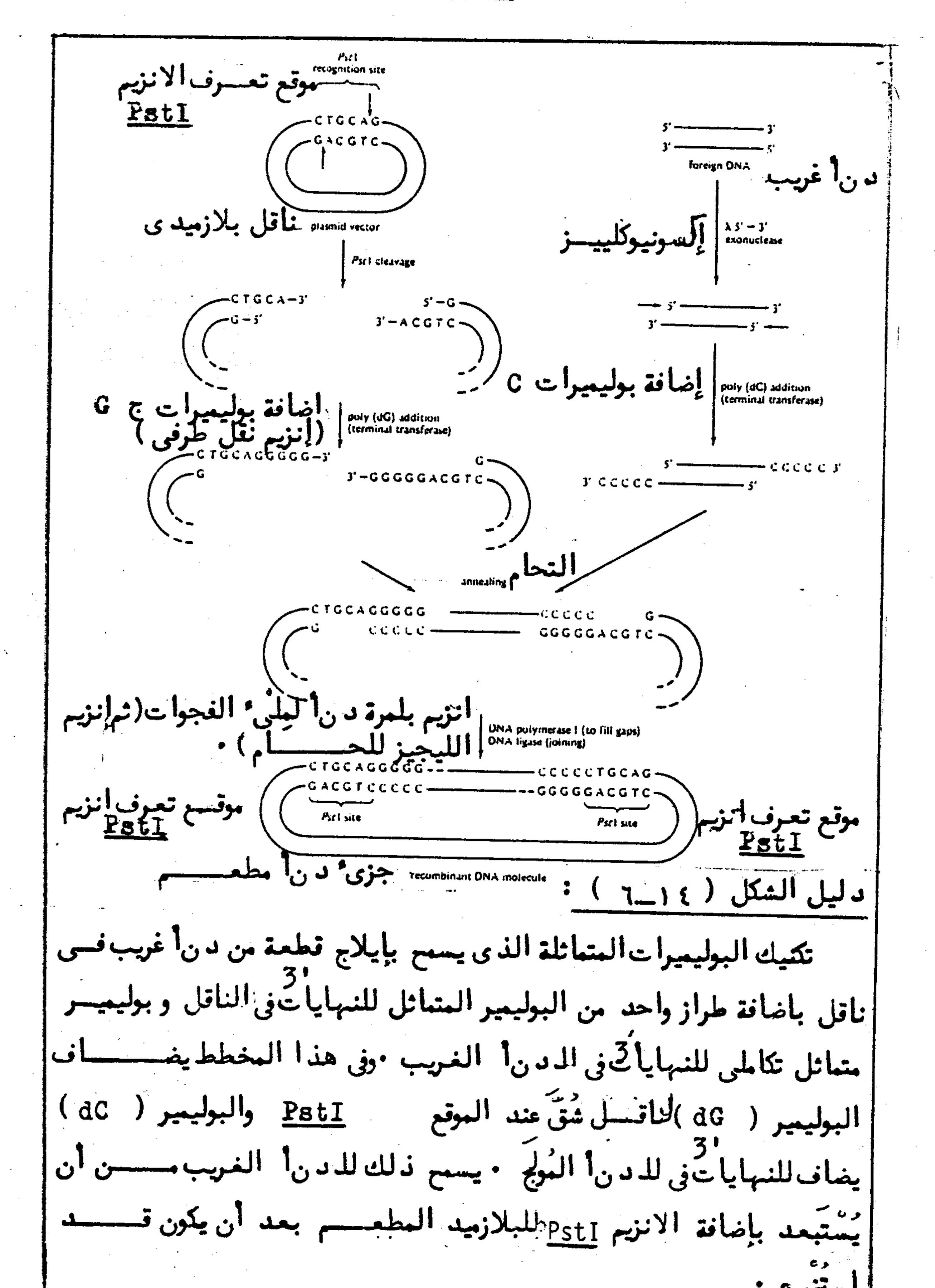
طريقـــة استعمـــال لحام النهايات الخشنة لربط جزيئات رابطـــة حاملة لموقع EcoRI لكلا النهايتين لشظية د ن أ غـــريب • ومعاملة هـــذه النواتج بانزيم EcoRI سوف يُولِّد نهايات لزجة والتى يمكنها بعد ذلـك أن تُكوِّن جزيئا د ن أ مطعما مع ناقل والذى عومل نفس المعاملـــة • وبـــعد استرزاع الناقل يمكن للـ د ن أ الغريب أن يُزال بانزيم الـ EcoRI • (ولمنع تَشْظية fragmentation مقاطع الـ د ن أ الغريب الحاملـــة لمواقع بيـــنية تتأثر بالانزيم EcoRI ، فإنّ الـ د ن أ الغريب يُمَيْثَـــل methylated فى هذه المواقع بانزيم مـــيثيليز الـ EcoRI قبل الوصـــل بجزيئات رابطـــة) •

تولج فى الناقلات يمكن أن تكون ناتجة إما من الهضم باستخدام إنزيمات قطع مناسبة أو بواسطة تكنيكات القص الميكانيكى . وإحدى طرق تخليق تتابع د ن أ مرغوب يسيطر شفريا على جين معين تشمل الـ م ر ن أ mRNA الخاص بالجين ، ثم يستعمل معه إنزيم النسخ العكسى reverse trans-scriptase لتخليق نُسْخَة من الـ د ن أ المسمى cDNA.

د ـ الطريقة المبرمجة : Programmed Method

لو كان البروتين المرغوب الحصول عليه صغيراً جداً (من ١٥ ـ ٢٠ حمض أمينى) وتركيبه البنائى الأولى معروفاً ، فمن الممكن ـ باستعمال معلومات الشفرة الوراثية ـ تخليق جزئ الـ د ن أ المقابل كيميائيا . ولقد بينت التجارب التى أجريت إمكان تنفيذ ذلك بالنسبة للهرمون " سوماتوستاتين Somatostatin (١٤ حمض أمينى كبروتين ، ويقابله ٤٢ قاعدة نوتيدية فى خيط الـ د ن أ الفَعَّال) .

ومن المعروف أن معظم البروتينات تتكون من سلاسل ببتيدية طويلة جدا ، مما يُصَعِّب من تخليق جزئ الـ د ن أ المقابل لها كيميائيا . وفى مثل هذه الحالة قد يلجأ المهندس الوراثى إلى عزل جزيئات الـ م ر ن أ mRNA النظيرة من الانسجة التى يُخَلَّق فيها البروتين المرغوب . فعلى سبيل المثال ، من المعروف أن الانسولين يُخَلَّق فقط فى أنسجة البنكرياس بالرغم من حقيقة أن جميع خلايا الجسم تحمل . "جين الانسولين" . فيتم عزل تحضير منقى من م ر ن أ الانسولين ثم يعامل بانزيم النسخ العكسى (r.transcriptase) لتخليق نسخة من د ن أ مفرد الخيط تكاملى (cDNA) ، ثم بعد ذلك يُجَرَّد قالب الـ م ر ن أ و يتبقى جزئ الـ د ن أ التكاملى ليعمل كقالب لتخليق خيط د ن أ جديد . ويمكن الحصول على إنزيم النسخ العكسى بعزله وتنقيته من الخلايا المصابة بفيروس



دليل الشكل (١٤ـ٦) :

تكنيك البوليميرات المتماثلة الذى يسمح بإيلاج قطعة من د ن أ غريب فـى ناقل بإضافة طراز واحد من البوليمير المتماثل للنهايات '3 فى الناقل و بوليمـر متماثل تكاملى للنهايات '3 فى الـ د ن أ الغريب .وفى هذا المخطط يضـــاف البوليمير (dG) للناقـل شُقَّ عند الموقع PstI والبوليمير (dC) يضاف للنهايات '3 فى للـ د ن أ المُولَج . يسمح ذلك للـ د ن أ الغريب مـــن أن يُستبعد بإضافة الانزيم PstI للبلازميد المطعـم بعد أن يكون قـد استُزرِع .

أورام الجروح wound tumor virus • وهناك إنزيم آخــــر يسمى
S1 يمكنه أن يَفصِم الروابط التساهمية بين خيطى الد ن أ عند طرفى الــد ن أ
ومن ثَمَّ يمكـــن إضافة مقطع قصير من قواعد صِنوية (مثل قواعد السيتوسيـــن)
للنهايات من الطرف ٣َ بواسطة إنزيم النقل terminal transferase.
ثم بعد ذلك يُعزل الناقل المطعم (مثلا بلازميد) ثم يُفْصَم عند أحد المواقــع
باستخدام إنزيم بينى مناسب ،ثم يعامل بواسطة إنزيم نقل طرفى وبوحدات مــن
نوتيدات الدى أوكسى جوانيدين ثلاثية الفوسفات لربطها مع نهايات البلازميد •
ثم بعد ذلك تعامل الخلايا المضيفة بمحلول مخفف من كلوريد الكالسيوم حـــتى
تصبح جُدُرِها مُنْفِذة للبلازميد المطعم مما يسهل دخوله إلى الخلية المضيفة •
ويجب أن يحتوى البلازميد المطعم على جين واحد أو أكثر مايسمح بالانتخاب
ضد الخلايا التى لم تلتقط ذلك البلازميـــــد (الشكل ١٤-٧) •

مثال تجريبى : إذا فرضنا أنّ بلازميداً مطعما يحتوى على الجين الخـــاص
بمقاومة التتراسيكلين ،فإنّ جميع خلايا المزرعة البكتيرية سوف تموت فى وجـــود
التتراسيكلين فيما عدا الخلايا التى التقطت البلازميد المطعم • ويجـــب أن
يلاحظ أنّ إنزيم القطع البينى الذى يَفْصِم البلازميد ليُولِّف معه الد ن أ التكاملـى
(cDNA) لابد له ألاّ يقطع داخل التتابع النوتيدى لجين مقاومة التتراسيكليـن،
لأنّ ذلك معناه تلف الجين الواسم المطلوب لعملية الانتخاب (الشكل ١٤-٧).

و تبين التجارب أن نسبة تمثل أقل من ١٪ من الخلايا المعاملة هــــى
التى تلتقط البلازميد المطعم • وعقب انتخاب هذه الخلايا ،فانه يمكن استزراعها
فى مزارع بكتيرية جديدة على آجار مغذى ،يحتوى على عنصر إنتخابى مضاد (وهو
التتراسيكلين فى حالتنا هذه) • ويؤدى ذلك إلى تكوين مستعمرات بكتيريـــة
حاملة للبلازميد المطعم • بعد ذلك تختبر المستعمرات لوجود البروتين المرغوب
فيه • وبمجرد توفرهذه المستعمرات، فإنه يمكن إكثارها كمزارع نقية مــــن

الشكل (١٤ ـ ٧) :

مخطط عام للاستزراع الجزيئى فى الكائنات بدائيات النوى :

(أ) البلازميد البكتيرى pBR322 (اللون الابيض) يحمل جينيين واسمين للمقاومة للمضادين الحيويين ، الامبسلين والتترلسيكلين على التوالى (الاجزاء المظللة) وهو يستعمل كناقل vector.

(ب) بإضافة إنزيم قطع بينى (إندونيوكلييز) خاص ، يَنْشَطِر البلازميد الموسوم pBR322 خلال جين مقاومة التتراسيكلين .

(جـ) بعد ذلك يضاف الدنأ الغريب (اللون الاسود) والذى عومل بنفس إنزيم القطع البينى الخاص .

(د) يلى ذلك إضافة إنزيم لحام الدنأ (الليجيز) .

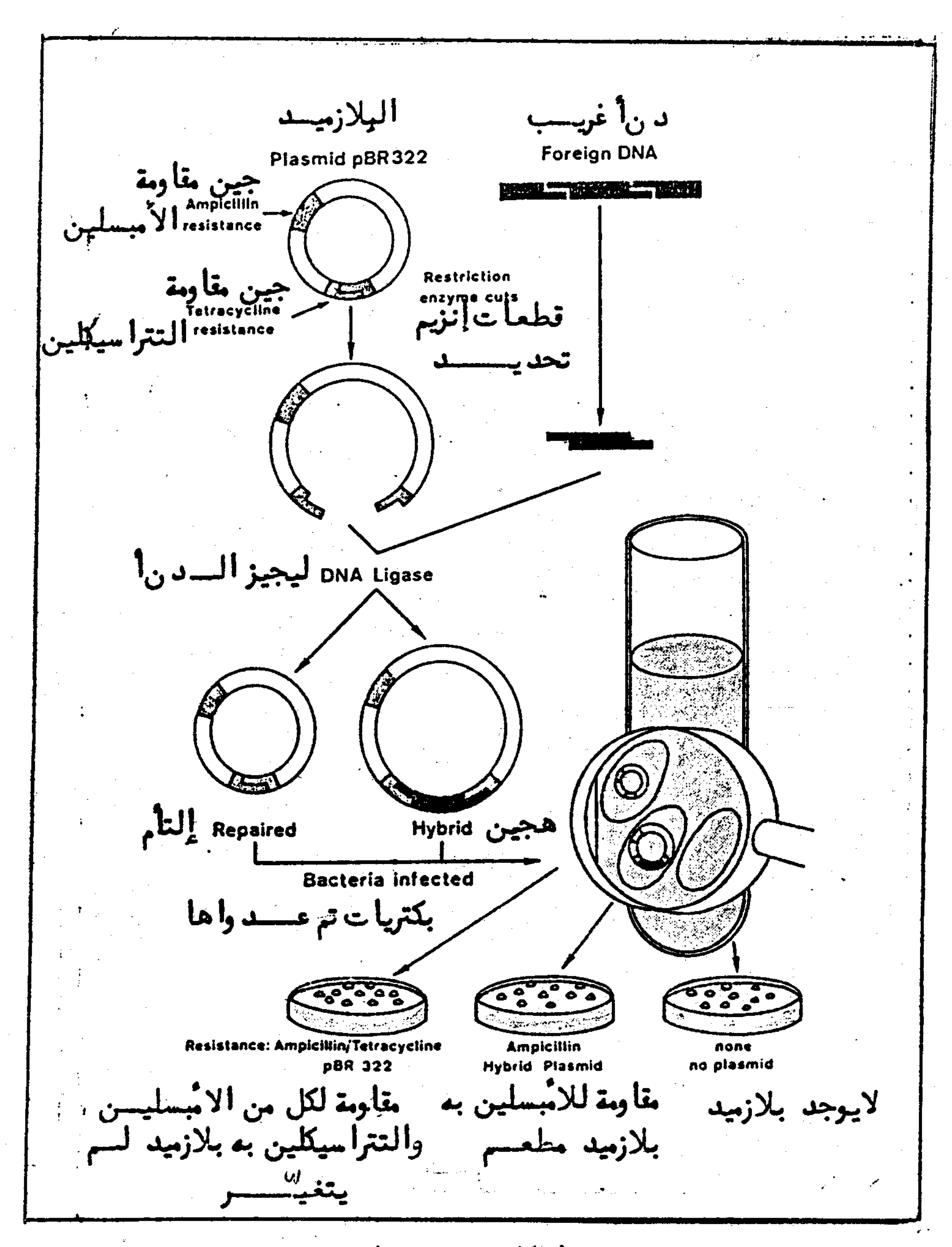
(هـ) عقب عملية اللحام ، يحتوى المخلوط على نوعين من البلازميدات ، البلازميد الاصلى الملتئم وبلازميد مُشَيَّد من جديد (بلازميد مطعم hybrid plasmid) يحتوى على الدنأ الغريب .

(و) يضاف المخلوط الى عشيرة من الخلايا البكتيرية ، ثم تؤخذ منها عينات تُفَرَّد على بيئات مختلفة ، وعقب النمو ، يمكن تمييز مستنبتات بكتيرية من طُرز ثلاثة حسب الجينات الواسمة :

١ ـ طراز يحمل المقاومة للامبسلين والتتراسيكلين (به البلازميد pBR322).
٢ ـ طراز يحمل البلازميد المطعم ، حامل لجين الامبسلين فقط .
٣ ـ طراز خال من البلازميد (غير مقاوم لكلا المضادين الحيويين).

ونتيجة لعملية التثبيط الايلاجى Insertional inactivation لجين التتراسيكلين ، فانّ الخلايا البكتيرية التى اكتسبت المقاومة فقط للامبسلين هى التى تكون حاملة للبلازميد المطعم بالدنأ الغريب .

(عن العالمين : Esser and Lang - Hinrichs, 1982).



البلازميد
Plasmid pBR322
د ن أ غريب
Foreign DNA
جين مقاومة
Ampicillin resistance
الأمبسلين
جين مقاومة
Tetracycline resistance
التتراسيكلين
Restriction enzyme cuts
قطعات إنزيم
تحديد
ليجيز الـ د ن أ
DNA Ligase
إلتأم
Repaired
Hybrid
هجين
Bacteria infected
بكتريات تم عدواها
Resistance: Ampicillin/Tetracycline
pBR 322
Ampicillin
Hybrid Plasmid
none
no plasmid
مقاومة لكل من الامبسلين والتتراسيكلين به بلازميد لم يتغير
مقاومة للامبسلين به بلازميد مطعم
لايوجد بلازميد

(شكل : ١٤ـ٧)

البكتريات المُهَنْدَسة وراثيا بكميات قياسية للانتاج على نطاق تجارى لتخليق المواد المطلوبـــــة ٠

وسائل الاستزراع الجيــنى : Gene Cloning Tools

تعتبر البلازميدات والفاجات عناصر تحتمجهرية قادرة على إصابة البكتريات واستعمال مكوناتها الخلوية لتكاثر نفسها ٠ وهى تحتوى على معلومات وراثيـــة مختزنة فى معظم الأحيان ـ فى جزيئات د ن أ قصيرة ٠ ولقد وجد باحثـــــوا البيولوجيا الجزيئية جزيئات د ن أ البلازميد والفاج ـ على وجه الخصوص ـ سهلة لتناولها ودراستها. ومن المعروف أنّ المعلومات الوراثية للكائنات الحيوانيـــة وغيرها من الكائنات توجد فى جزيئات د ن أ طويلة جدا مما يَصْعُب معه دراستها مالم تُقَطَّع هذه الجزيئات إلى مقاطع صغيرة وتُعْزَل من بعضها ٠ ولقد وُجِــــد أنّ البلازميدات والفاجات هى التى تساعدنا فى فصل شظايا الد ن أ ٠ ولمـــا كان من الممكن لَصْق شظايا الد ن أ فى د ن أ البلازميد والفاج دون أن يفقـــدا قدرتهمــــا على الاصابة ، فإنّ هذه العناصر الدقيقة المعدية يمكن استعمالها كوسائل نقل لتحريك أى مقطع من الد ن أ داخل أى خلية بكتيرية حية ، حيـــث تقوم شظية الد ن أ هذه بالتكاثر كجزء من د ن أ البلازميد أو الفــــاج ٠

الناقلات البلازميديـــة : Plasmid Vectors

كما سبق أن ذكرنا فى الباب الرابع نجد أنّ البلازميدات عبارة عن جزيئـــات د ن أ مزدوجة الخيط صغيرة دائرية الشكل (أنظر الشكل ٤ ـ ١٠) توجد طبيعيا فى الخلايا البكتيرية ٠ وكما هو الحال فى كل جزيئات الـ د ن أ الطبيعية ، تحتوى البلازميدات على منطقة خاصة فى جزىء الد ن أ الخاص بها تسمى "منشأ التناسخ Origin of replication" ٠ ويخدم هذا المنشأ كاشارة بدء start signal

لانزيم بلمرة الـ د ن أ ،وهو يضمن التناسخ لجزئ د ن أ البلازميد بواسطة الخلية العائلة . ولقد تم اكتشاف العديد من أنواع البلازميدات فى كل من الكائنات بدائيات ومميزات النوى (الباب ٤) . وتختلف أنواع البلازميدات فى طول محيطها وفى عدد الجينات المُشَفَّرة فى الـ د ن أ المكون لها . فبعض البلازميدات الصغيرة والشائعة الاستعمال فى الهندسة الوراثية ــ تحتوى على حوالى ٥٠٠٠ زوج نوتيدى ، وهذا الكم من الـ د ن أ كافٍ ليُشَفِّر لحوالى خمس بروتينات متوسطة الحجم . وعلى سبيل المقارنة نجد أنّ خلية بكتريا القولون (إ .كولاى) تحتوى على أكثر من أربعة ملايين زوج نوتيدى فى الـ د ن أ الخاص بها ،بينما تحتوى الخلية الآدمية على حوالى أربعة بلايين زوج من النوتيدات . ولقد وُجِد أنّ العديد من البلازميدات كبيرة الحجم يصعب تداولها كما أنها تكون قابلة للانتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى ،لذلك فإنّ هذه البلازميدات تكون غير مناسبة ولا تستعمل فى الاستزراع الجينى . ولسوف نَعرِض فى جزء لاحق طريقة عملية عامة للاستزراع بواسطة البلازميدات .

ويتوقف تصميم الأنظمة التى تسمح بعزل العديد من النُّسَخ المتكاثرة من مقطع معين من الـ د ن أ على نوع الناقل (vector) المستعمل لحمل قطعة الـ د ن أ المُولَجَة فيه إلى الخلايا المضيفة ،حيث يمكنها الاستزراع والتكاثر . والبلازميدات المعزولة من كائنات بكتيرية (مثلا بلازميد ColEI) هى وسائل الاستزراع المعتادة ،وذلك بسبب قدرتها على البقاء والتناسخ داخل الخلايا المضيفة ،وفيما يلى الخصائص العامة التى يجب توافرها فى الناقلات البلازميدية المستخدمة فى الهندسة الوراثية :

١ـ صغر الحجم small size،حتى يستمر ثباتها .

٢ـ السيطرة المسترخية relaxed control تكاثرها مستقل عن الكروموسوم المضيف ،مما يسمح بوجود العديد من نسخ بلازميد ما فى الخلية يعطى نُسَخاً أكثر من تتابعات الـ د م د ن أ المولجة .

٣ـ الانتقال اللاتزاوجي non-conjugative transmission وهذه خاصية أمان تجعل هذه البلازميدات غير قادرة لان تنقل نفسها من خلية لاخرى ، وبدلا من ذلك فانها تضع عملية التحوّل الوراثى (genetic transformation) أو انتقال الدنا البلازميدى تحت سيطرة المهندس الوراثي .

وكنظام عام لتحوّل الخلايا – على سبيل المثال إ.كولاى – بواسطة الدنا البلازميدى هو أن تُجْعَل جُدُر الخلايا قابلة للنفاذية بمعاملتها بمواد خاصة كأيونات الكالسيوم . ولما كان مُعَدّل التحوّل عادة منخفضا – حتى بعد هذه المعاملة – فهناك ضرورة إضافية وهى أنّ الخلايا المضيفة المُحَوَّلة بالبلازميدات يجب أن يكون فى مقدورها أن تُعَبّر عن نفسها بمظهر فريد . و علاوة على ذلك ، لما كانت بعض الناقلات البلازميدية قد تحمل إيلاجات الدنا الغريب ، بينما البعض الآخر لايحمل هذه الايلاجات inserts ، فمن المهم أنّ تحمل الخلايا المُحَوَّلة مظهرا آخر يميزها ، حتى يمكن للخلايا الحاملة للبلازميد ذى الدنا المطعم فقط من أن تنتخب للاستزراع (الشكل ١٤ـ٧) . وعموما فان الواسمات markers البلازميدية المستعملة لهذه الاغراض هى تلك الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية . فعلى سبيل المثال ، لو فرضنا أنّ ناقلا يحمل جينات لمقاومة مضادين حيويين هما X و Y يحتوى على موقع تأثير لانزيم قطع (restriction site) فى الجين Y ، حيث يولج فيه دنا معامل بطريقة مناسبة ، مما يسبب تثبيطا للجين Y (تثبيط إيلاجى insertional inactivation) ، يترتب على ذلك أن الخلايا الحساسة لكلا المضادين الحيويين ، والتى تحولت بواسطة هذا الناقل البلازميدى سوف تظهر مقاومة للمضاد X وحساسية للمضاد Y ، وهذا يمثل مظهرا مميزا عن الخلايا التى قد تكون إما خالية من الناقل (حساسة لكل من X و Y) أو تحمل الناقل بدون المقطع المُولَج من الدنا (مقاومة لكل من

المضادين X و Y) . وأحد الناقلات البلازميدية شائعة الاستعمال هـو البلازميد pBR322 ،وقد تم تشييده بمجهود كبير من مقاطع من الـ د ن أ من بلازميدات أُخَر عديدة ،وذلك لاثرائه بكل من جينات المقاومة للمضادات الحيوية وتهيئته بمواقع لتأثير إنزيمات القطع فى أماكن محددة بمنتهى الدقة . وكما هو مبين فى الشكل (١٤ – ٨) يحتوى هذا البلازميد على جين لمقاومة الامْبسلين (amp^R) ،وجين لمقاومة التتراسيكلين (tet^R) ،وعلى تتابع د ن أ لاستهلال التناسخ (ori) وكذلك على عدد من مواقع القطع restriction sites ،ويضمنها البعض الذى وجد مرة واحدة فقط .ولما كان اثنان من مواقع الشج cleavage sites الفريدة فى البلازميد pBR322 توجدان فى داخل الجين amp^R ،وثلاث فى الجين tet^R ،فان هذه المواقع توفر فرصة جيدة للتعرف على د ن أ البلازميدات المطعم من خلال التثبيط الايلاجى . فعلى سبيل المثال نجد خلايا إ.كولاى الحساسة للمضادات الحيوية والتى حُوِّلت بواسطة بلازميدات pBR322 والتى تحتوى إيلاجات د ن أ فى الموقع BamHI سوف تكون حساسة للتتراسيكلين لكنها مقاومة للامْبسلين .

تعبير الجينات فى الناقلات البلازميدية : Gene expression in plasmid vectors

إنّ دمج شظايا د ن أ فى ناقلات بلازميدية لايسمح فقط للد ن أ الغريب بأن يتناسخ فى الخلايا المستزرعة ،وللعزل والتمييز بعد ذلك ،لكن أيضا يمكن أن يُخَطَّط له بحيث أنّ الخلايا تنسخ وتترجم هذا الد ن أ الى بروتينات . وفى الحالة الاخيرة ،تُولَج الجينات الغريبة فى بلازميدات عند مواقع مجاورة (أسفل المجرى downstreame) لمحفزات النسخ . وعندما تعمل بكتريا المعى (إ.كولاى) كمضيفات خلوية ،فانّ المحفزات التى تستعمل عادة تشمل تلك الخاصة بالجينات lac (محفز اللاكتوز) ، trp (محفز التريبتوفان) ،وكذلك

دليل الشكل (١٤ــ٨) :

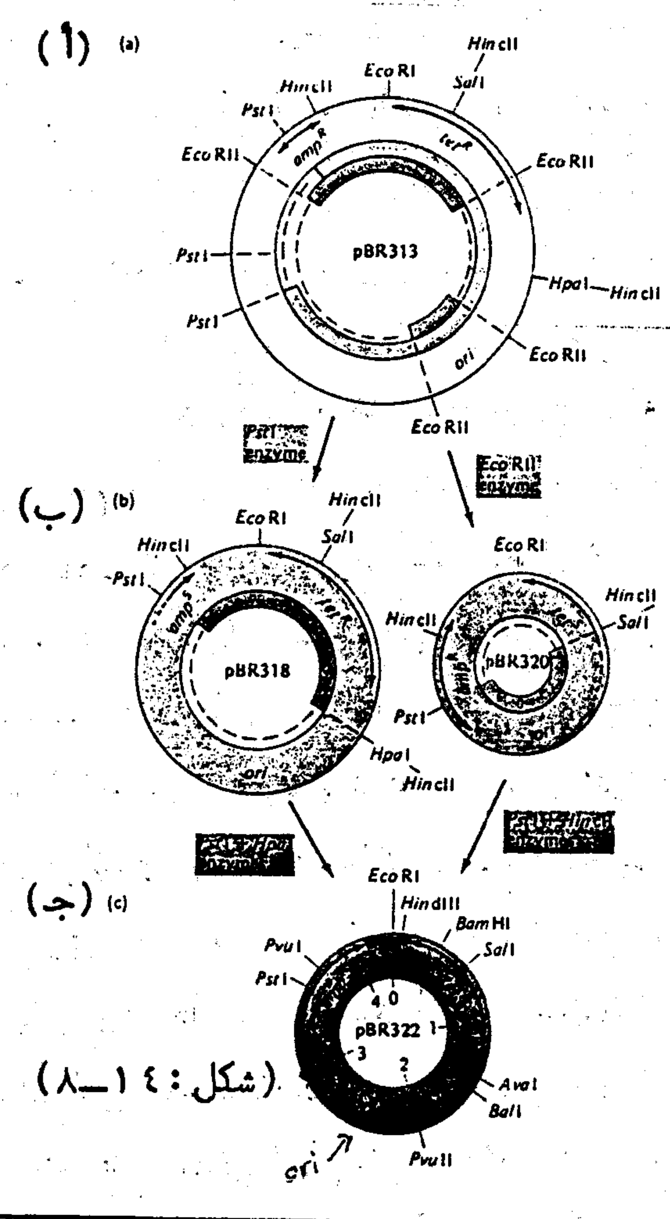
الرسم التخطيطي المستعمل في الأطوار النهائية لتشييد البلازميد الاصطناعي pBR322 ٠

(أ) البلازميد pBR313 كبير نسبيا (وزنه الجزيئي 5.8×10^6D) ويحتوي على موقعين للتعرف بالاضافة لواحد موجود في موقع جين المقاومة للامبسلين amp^R ولأجل الحصول على ناقل ذي حجم منقوص يحتوي فقط على موقع Pstl واحد (في موقع الجين amp) فلقد اشتق بلازميدان آخران من البلازميد pBR313 (أن وجود موقع Pstl واحد في الجين amp دون غيره من هذه المواقع ، يضمن أن جزئيات الدنا المولجة في الموقع Pstl الناقل يمكن ادراكها بواسطة استحداث عدم تنشيط إيلاجي insertional inactivation للجين amp) .

(ب) تعريض البلازميد pBR313 للمعاملة بـ Pstl نتج عنه فقد شظيتين Pstl (الجانب الشمال ــ الخط المتقطع الخارجي) وسمح بظهور البلازميد pBR318 (اللون الخفيف) والذي يحتوي على جزء منقوص من الجين amp ، ولذلك يكون حساسا للامبسلين (amp^s) . ومعاملة البلازميد pBR313 بانزيم القطع EcoRII أنتج البلازميد pBR320 (اللون الرمادي) والذي يحتوي على جين كامل للامبسلين amp به موقع Pstl) لكنه يحتوي على فقد في جينه المقاوم للتراسيكلين ، ومن ثم يصبح حساسا للتراسيكلين (tet^s) .

(جـ) عندما عومل البلازميد pBR318 بالانزيمات Pstl و Hpal والبلازميد pBR320 بالانزيمات Pstl و HincII ، فان بعضا من الشظايا التي تكونت نتيجة لهذه المعاملات (اللون الغامق)

يمكن أن تُلحم مع بعضها لانتاج البلازميد pBR322 والذى يحتوى على تتابعات كاملة للجينين amp^R , tet^R ، والبلازميد pBR322 له وزن جزيئى أقل من نصف البلازميد pBR313 ، كما أن تتابع أزواج النوتيدات الخاص به وقدره 4362 زوجا (مُبيَّن ذلك داخل الدائرة) قد أمكن تَحْدِيدُ تتابعاته كلية . ومبين أيضا مواقع تَعرّف لعدد من الانزيمات والتى تحدث عادة مرة واحدة على البلازميد pBR322 (أما إنزيمات القطع الأخر غير المبيَّنة فيكون لها أكثر من موقع تَعرّف واحد فى البلازميد).



(شكل : ٤ ١ ـ ٨)

مُحَفِز PL ،وكذلك توليفات هجينة مثل (tac) trp-lac .

وكمثال واضح لتعبير الجين فى جزئ د نأ مطعم ،نعرض ماتم من استعمال مُحَفِزّ التريبتوفان trp فى تخليق إنزيم الحيوانات الثديية كيموسين (الرِّنين) والذى يعمل كبروتينيز فى الافرازات المعوية . ومثل كثير من البروتينات المُفْرَزة ، فإنّ الكيموسين عادة مايُخَلّق كجزئ على شكل "بادئة كيموسين أولية "preprochymosin" أطول من الحجم النهائى للانزيم . والرمز pre يشير الى ببتيدة إشارة بدء start signal متصلة وهى التى قبل أن تزال تُمكِّن البروتين من أن يُفرز من الاغشية الخلوية ،والرمز pro يشير إلى ببتيدة تنفصل فيما بعد وتُستبعد ،وذلك لتنشيط الانزيم . وفى التجارب التى أجراها العالم "إمتاج Emtage "ومعاونوه ،تم عزل جين "بادئة الكيموسين" من خلايا بكتيرية سبق استزراعه فيها على شكل نسخة من cDNA د نأ مستزرع (cloned DNA)للد م رنأ الخاص بالكيموسين .

(ملحوظة: الد نأ المستزرع cDNA لمميزات النوى له ميزة إمكان عزل "الانترونات introns " من الد م رنأ الذى يعمل كقالب للـ cDNA ، وهذه عملية إزالة لايمكن للخلايا البكتيرية أن تقوم بها طبيعيا) . وكما هو مبين فى الشكل (١٤ ـ ٩) فان المقطع الابتدائى " pre"للجين قد استبعد بواسطة إنزيم القطع المتخصص BamHl تاركا مقطع د نأ إنزيم البروكيموسين prochymosin الذى أُولج بعد ذلك فى بلازميد مجهز خصيصا يحمل الجين المحفز trp . وبعد ذلك استحثت عملية نَسْخ جين البروكيموسين وذلك بتنمية الخلايا فى بيئة خالية من الحمض الأمينى تريبتوفان ،وتلى ذلك مباشرة عملية الترجمة ،وذلك لأن موقع ربط ريبوسومى خاص من إ.كولاى (يسمى التتابع shine - Dalgarno) وشفرة استهلال (ANG) قد وُصِّلتا فى المواقع المناسبة فى الناقل البلازميدى . بعد ذلك عُرِّضت الخلايا المتحللة lysed لمحلول حمضى ،حيث يعمل ذلك على إزالة الببتيدة من البروكيموسين وسحب

معظم البروتين البكتيرى • ونتيجة لهذه العملية وغيرها من العمليات ،فقد أمكن بيان أن خلايا إ •كولاى تنتج مابين ٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠ جزئ من الكيموسين الشديد النشط النقى (وهو يمثل مابين ١ الى ٥٪ من كل البروتين الخلوى) ،وهذا نجاح يشير الى القوة الهائلة لهذه التكنيكات•

استخدام البكتريوفاجات كناقلات فى الاستزراع الجينى

مقدمـــــة :

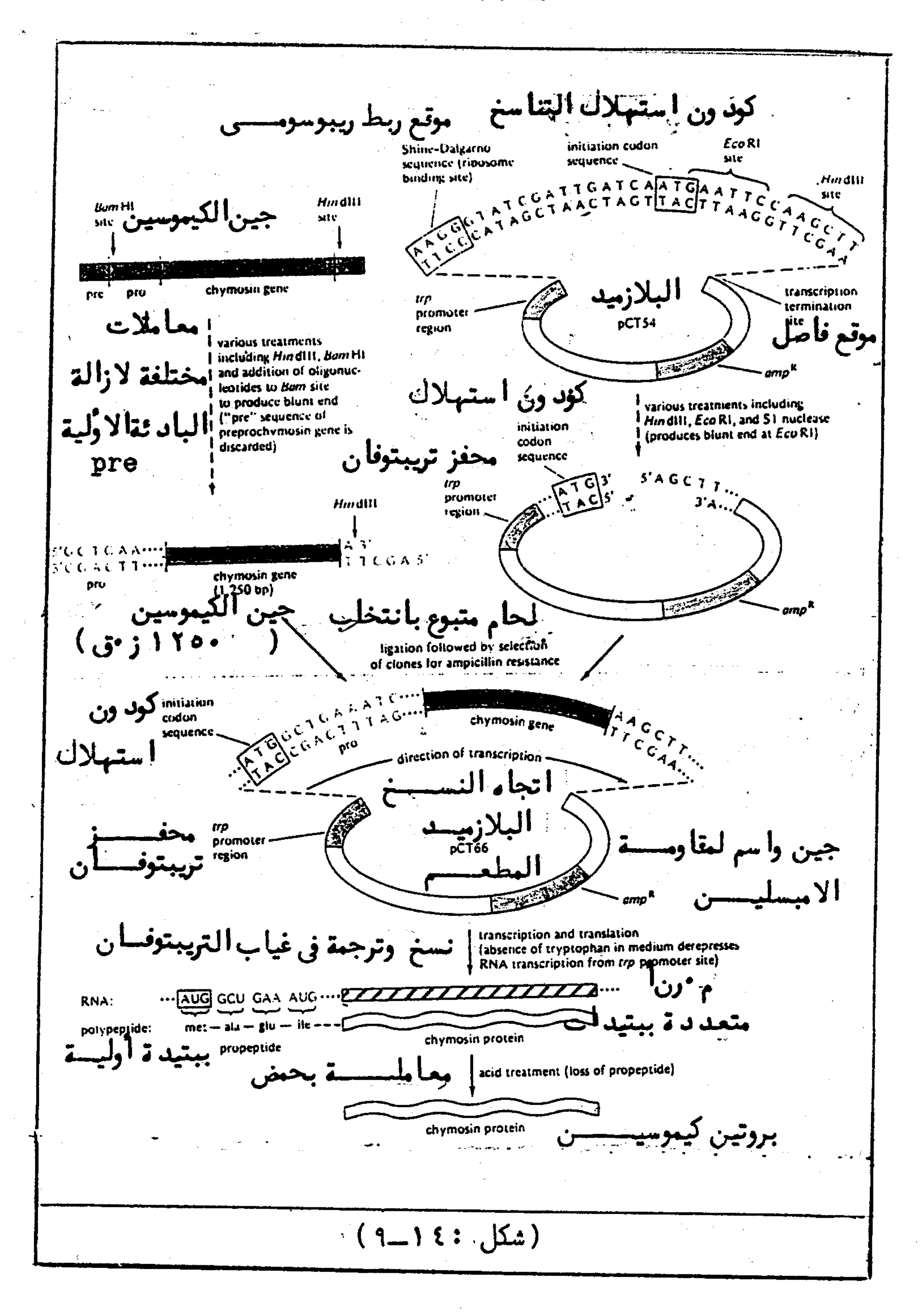
كما هو معروف تتكون البلازميدات من جزيئات د ن أ عارية ودائرية الشكل، ويحتوى كل جزئ على منشأ للتناسخ • أما البكتريوفاجات والتى عادة تسمى الفاجات فهى نسبيا أكثر تعقيدا • فبالاضافة لاحتوائها على منشأ للتناسخ فأنّ الـ د ن أ الفاجى يحمل جينات تُشَفِّر لبروتينات تكوّن الغلاف البروتينى حول الـ د ن أ • وكما هوالحال بالنسبة للبلازميدات ،فإنّ الفاجات تفتقر إلى الميكانيكية الضرورية لتخليق البروتين • ويترتب على ذلك أنها تتكاثر داخل الخلايا البكتيرية الحية فقط• ويمكن لكلٍّ من الفاجات والبلازميدات أن تستعمل لفصل وتكبير amplify شظايا محددة من الـ د ن أ ،لكن كلامنهما له طريقة مختلفة للتناسخ ،وبناء على ذلك تستخدم استراتيجيات مختلفة لاستعمالهما فى الاستزراع الجينى •

وكما توضح صور المجهر الالكترونى (الشكل ١٤ـــ١٠) ،نجد أنّ العديد من الفاجات يشبه المحاقن التحجلدية Hypodermic syringes • ويكون د ن أ الفاج ملفوفا داخل غلاف كروى من البروتين يسمى الرأس، ويتصل بها ذنب (tail) من البروتين أيضا • وعندما يلامس جُسَيم فاجى خلية بكتيرية ،فإنّ ذنب الفاج يلتصق بجدار الخلية وينزلق الـ د ن أ من الرأس خلال الذنب إلى داخل البكتريم (أنظر الشكل ١٤ـــ ١١) • وبمجرد دخول الـ د ن أ الى الخلية فانه يبتدئ فى السيطرة عليها • ولقد وجد أنّ بعض الجينات الخاصة بالفاج

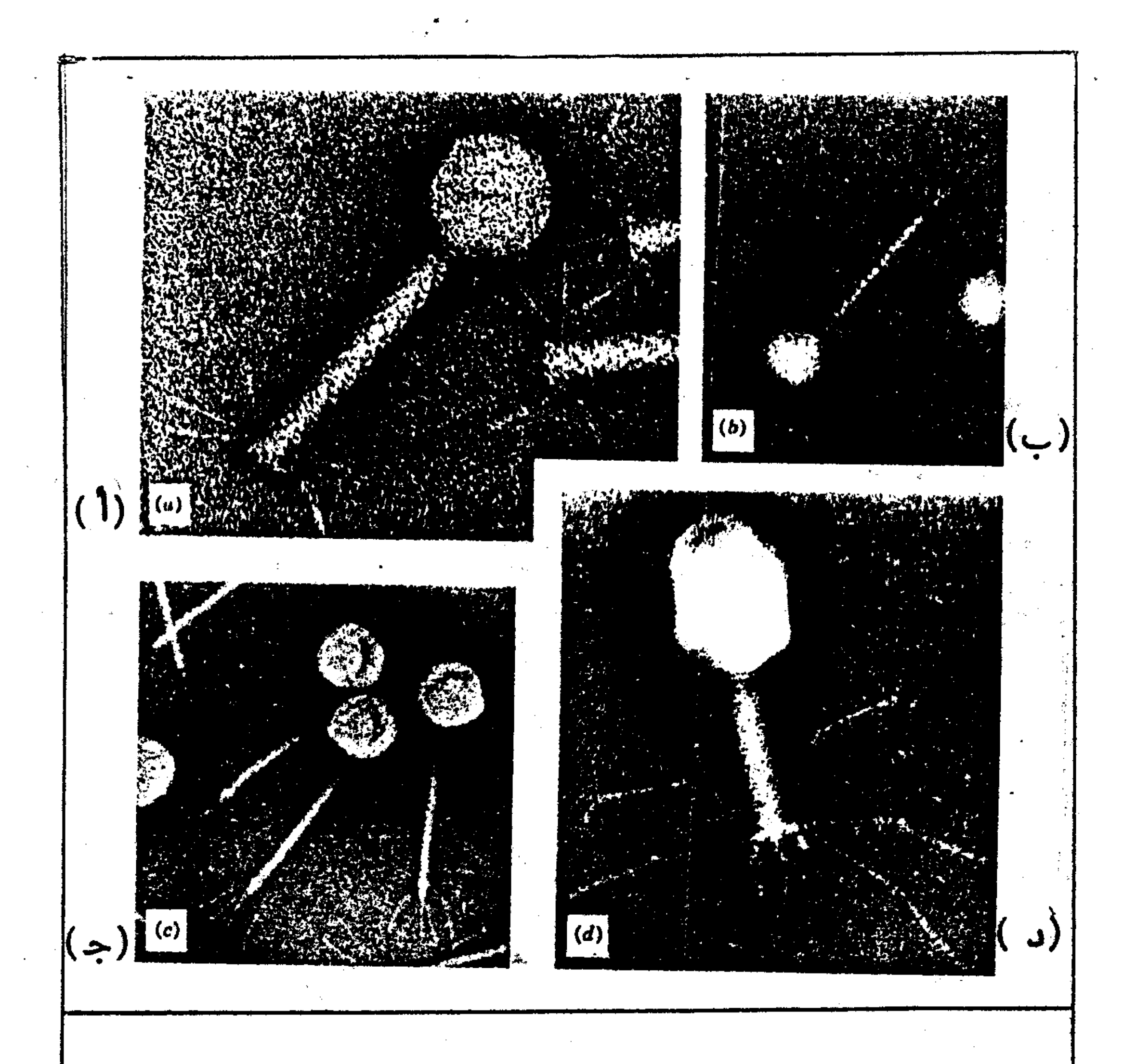
دليل الشكل (١٤-٩) :

مخطط بسيط لبعض الخطوات التى استعملها العالم Emtage ومعاونوه فى تخليق جزيئات نشطة نقية من الانزيم الثدييى (كيموسين chymosin) فى خلايا إ • كولاى • الرسومات ناحية الجزء الأعلى من الشمال تشير إلى تحضير تتابع الد ن أ الخاص بالبروكيموسين للايلاج فى الموقع EcoRI - HindIII للناقل البلازميدى PCT 54 (الرسومات ناحية الجزء الأعلى من اليمين) • الكلونات البكتيرية الحاملة للناقل المُولَج فية (PCT 66) يمكن التعرف عليها بواسطة المقاومة للامبسلين • فى البيئة المناسبة (فى غياب حمض التريبوفان) تتكون نُسْخَة transcript من الم • رن أ للجين بروكيموسين ، والتى بعد ذلك تُتَرجم إلى متعددة ببتيدات بروكيموسين كاملة • بعد ذلك يزال مقطع البروببتيدة من البروتين بالمعاملة بحمض تاركاً إنزيم الكيموسين النقى •

(لسهولة فهم الموضوع ، يُنْصَح القارىء بالمعرفة التفصيلية بتنظيم الجين التركيبى والجين التنظيمى ، وكذلك ضبط إيقاع وتنظيم عمل الجين - الباب الثانى عشر من هذا الكتاب) •

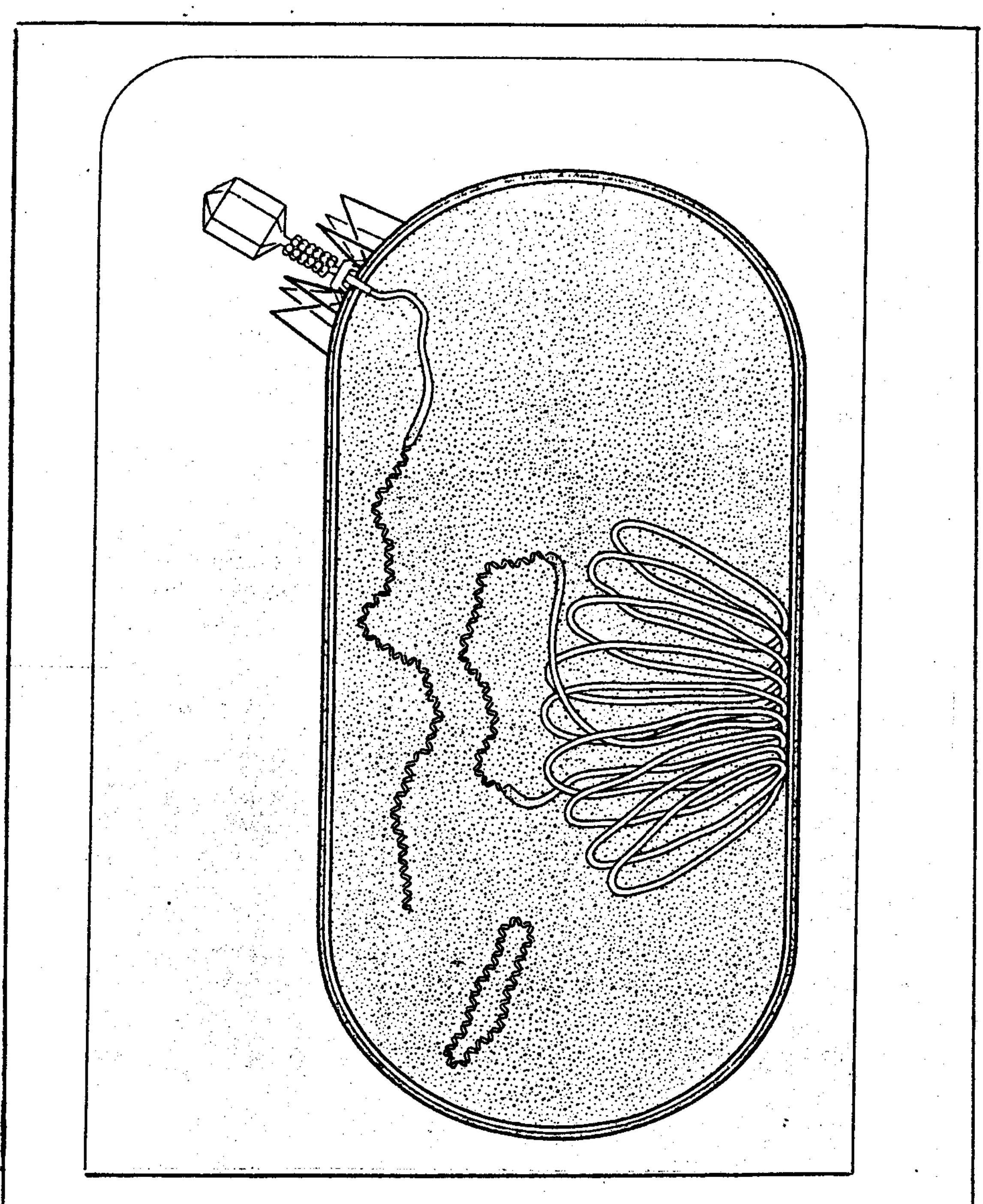

كودون إستهلاك التناسخ
موقع ربط ريبوسومى
Shine-Dalgarno sequence (ribosome binding site)
initiation codon sequence
EcoRI site
HindIII site
جين الكيموسين
BamHI site
HindIII site
pre
pro
chymosin gene
البلازميد
pCT54
trp promoter region
transcription termination site
موقع فاصل
amp^R
معاملات مختلفة لازالة البادئة الأولية pre
various treatments including HindIII, BamHI and addition of oligonucleotides to Bam site to produce blunt end ("pre" sequence of preprochymosin gene is discarded)
كودون استهلاك
initiation codon sequence
various treatments including HindIII, EcoRI, and S1 nuclease (produces blunt end at EcoRI)
محفز تريبتوفان
trp promoter region
HindIII
chymosin gene (1,250 bp)
جين الكيموسين (١٢٥٠ ز ق)
لحام متبوع بانتخاب
ligation followed by selection of clones for ampicillin resistance
كودون استهلال
initiation codon sequence
chymosin gene
direction of transcription
اتجاه النسخ
محفز تريبتوفان
trp promoter region
البلازميد pCT66 المطعم
جين واسم لمقاومة الامبسلين
amp^R
نسخ وترجمة فى غياب التريبتوفان
transcription and translation (absence of tryptophan in medium derepresses RNA transcription from trp promoter site)
RNA: AUG GCU GAA AUG
م رنا
polypeptide: met — ala — glu — ile
متعددة ببتيدات
propeptide
ببتيدة أولية
chymosin protein
معاملة بحمض
acid treatment (loss of propeptide)
chymosin protein
بروتين كيموسين

(شكل: ١٤ـ٩)



شكل (١٤ ــ ١٠) : صور بالمجهر الالكترونى للبكتريوفاجات.
(أ) البكتريوفاج P2 ،التكبير ٢٦٠٠٠ مرة.
(ب) البكتريوفاج لامبدا (λ) ، التكبير ١٠٩٠٠٠ مرة.
(جـ) البكتريوفاج T5 ،التكبير ٩١٠٠٠ مرة.
(د) البكتريوفاج T4 ،التكبير ١٨٠٠٠٠ مرة.

(الصور بتفضل من روبلى وليامز ــ جامعة كاليفورنيا ــ بيركلى ــ عــن كتــــاب: (DNA Cloning, Karl Drlica, 1984

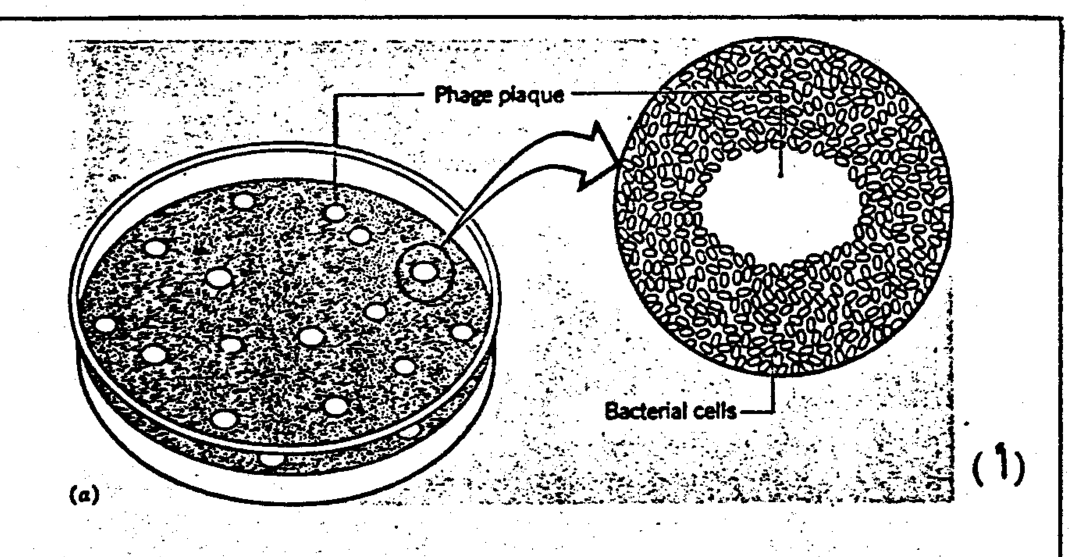


شكل (١٤ -١١) : يمكن للخلايا البكتيرية أن تحوى بداخلها عـــددا مختلفا من طرز جزيئات الدنأ . ناحية الشمال : بكتريوفاج يحقن جزىء الدنأ الخاص به داخل البكتريم ، بينما يظل غلافه البروتينى خـــارج جـــدار الخليـــــة .

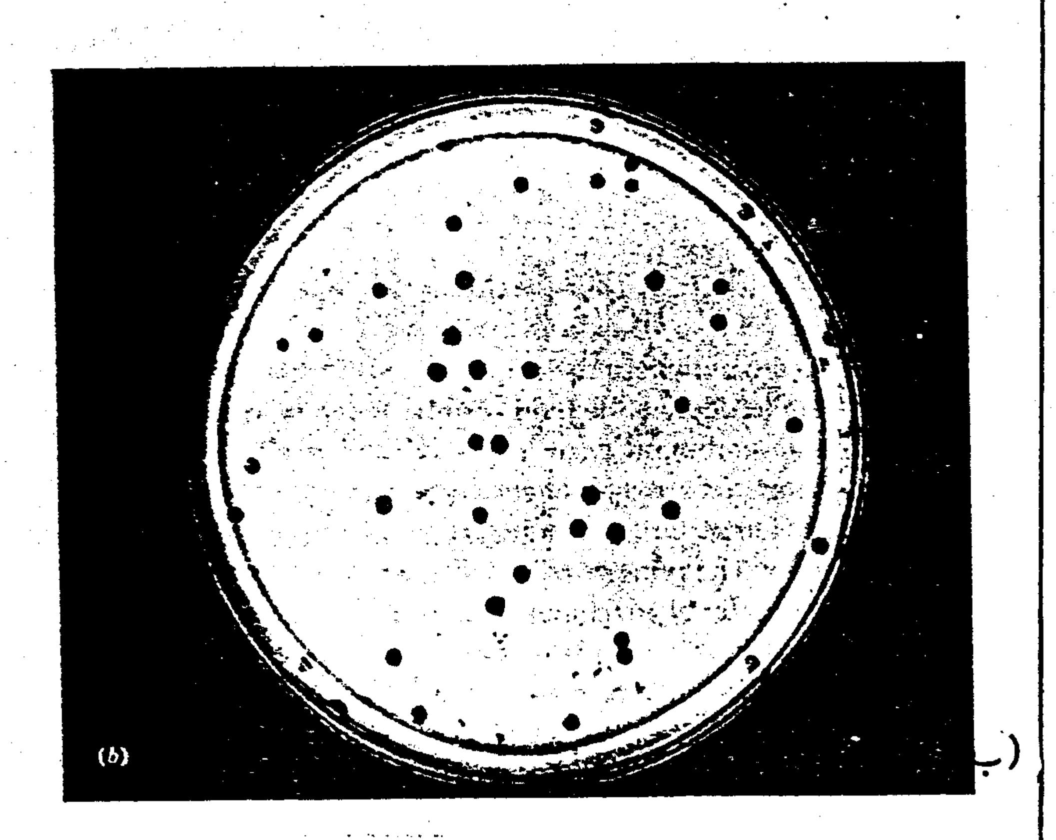
يتم استنساخها (transcriped) بواسطة إنزيم بلمرة الـ رنأ البكتيري، حيث يتم ترجمة جزيئات الـ م•رنا الناتجة إلى بروتينات الفاج مُسْتَعمِلة في ذلك الريبوسومات البكتيرية • وفي أطوار الاصابة الاولى ، تُنْتِج بعض الفاجات بروتينات تُتْلِف الـ د ن أ البكتيري مُفَرِّدَةً إيَّاه إلى نوتيدات فردية • وعندما يحدث ذلك تموت الخلية البكتيرية حيث أنّ جميع المعلومات اللازمة لتكاثرها تكون قد تلاشت ، وتوجد بعض الفاجات التي تحمل جينات تُخَلِّق إنزيم بلمرة الـ ر ن أ ، ولذلك فهي ليست في حاجة لأنْ تعتمد على إنزيمات البلمرة الخاصة بالعائل لتُخَلِّق م•رنأ من جينات الفاج ذاتـه •

ويحتوي الكثير من الفاجات على جينات تسيطر على ميكانيكية تناسخ الـ د ن أ الخاص بها • وعندما تتواجد تلك الجينات ،فإنّ هذه الفاجات يمكنها استعمال النوتيدات المنفصلة من الـ د ن أ البكتيري لتخليق الـ د ن أ الفاجي ،حيث تتخلق مئات النُّسَخ من د ن أ الفاج ،وفي خلال دقائق معدودات تُشَغَّل (turned on) جينات أخر على د ن أ الفاج لتخليق بروتينات رأس وذنب جديدة ،حيث يُصَرّ الـ د ن أ في البروتينات المكوِنَة للرأس ويتكون الذنب لكل منها • ويتم تخليق الفاجات الجديدة تلقائيا ولا يستغرق ذلك أكثر من ٢٠ دقيقة •

ويمكن التعرف على البكتريات المصابة بالفاج عن طريق تكوين بقع رائقة (plaques) على المروج (lawns) البكتيرية النامية على الآجار في أطباق بتري (الشكل ١٤ — ١٢) •وعندما تلتحم شظية د ن أ في جزيء د ن أ فاج ما — دون أن تتلف الجينات الهامة للفاج ،فإنّ هذا الفاج سوف يُكاثِر هذه الشظية مع الـ د ن أ الخاص به عندما يصيب خلية بكتيرية • ويمكن لمستزرعي الجينات (gene cloners)تحديد أيّ البقع البكتيرية المصابة بالفاج المحمل به مقطع الـ د ن أ الغريب،باستعمال المَسابِر (المجسات) المشعة radioactive probes وذلك لاختبار البقع للـ د ن أ المحتوى أزواج قواعد تكاملية لجين محدد • وبمجرد الحصول على البقعة المناسبة يتم عزلها



(أ)



(ب)

شكل (١٤ ـ ١٢) : البقع الرائقة plaques للبكتريوفاج · مُسَطّح من الآجار مغطى بمَرْج lawn من البكتريات· تمثل الحفر فى المَرْج مناطق قتلت فيها الفاجات البكتريا · وتسمى الحفر بالبقع الرائقة plaques ·(أ) رسم تخطيطى ،(ب) صورة واقعية ·

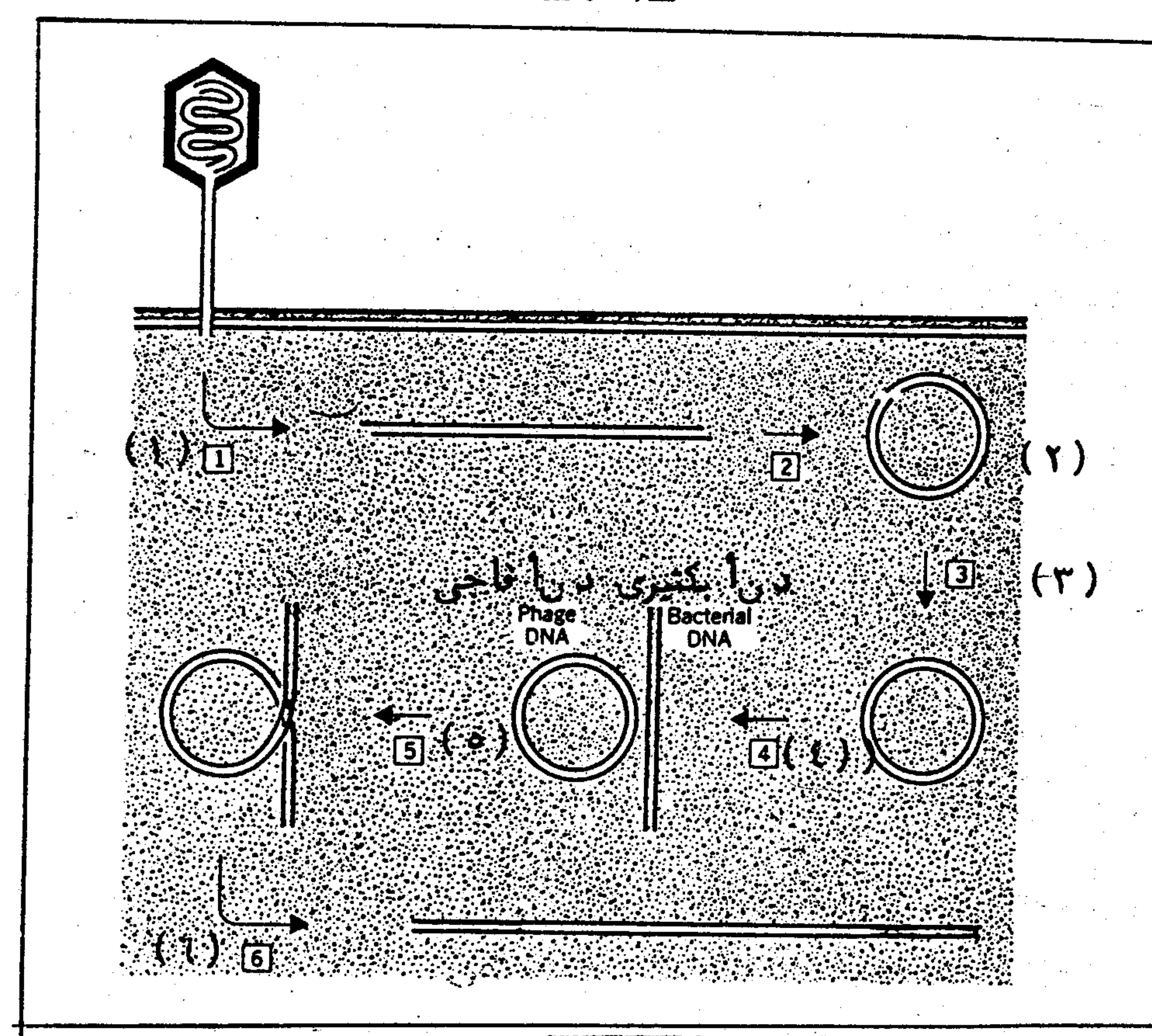
بتكنيكات خاصة ،حيث تستعمل فى مجالات الهندسة الوراثية المختلفة .

ويعتبر الفاج لامبدا Lambda (λ) من أكثر البكتريوفاجات المستعملة فى الكلونة الجينية ،وهو نسبيا اكثر تعقيدا من الفاجات المصورة فى الشكل (١٤ ـ ١٠) . وقد أشرنا فى الباب الثانى الى التركيب المتميز للفاج لامبدا λ (الشكل ٢ ـ ٢٤) والذى جعله من أكثر الناقلات استعمالا فى تحريك الجينات فى تقنيات الهندسة الوراثية . وعندما يحقن د ن أ الفاج لامبدا فى خلية بكتيرية يكون له اختياران: فإمّا أنْ يكون شَرِساً virulent ويتلف محتويات الخلية البكتيرية ،أو قد يكون معتدلاً temperate ويستقر داخل الخلية . وفى الحالة الاخيرة يُولِج insert الد ن أ الخاص به فى الكروموسوم البكتيرى (أنظر الدورة الليسوجينية فى الباب الثانى ،وكذلك الشكل ١٤ ـ ١٣) . وفى هذه الحالة تُثَبَّط الجينات الفاجية المسئولة عن إنتاج البروتينات القاتلة للخلية البكتيرية ،بواسطة بروتين مثبط (a repressor protein) مُخَلَّق من جين فاجى .

وعندما تحدث عملية لَسْجَنة بفاج حامل لجين مُسْتَزْرَع ،فانّ وضعا ينشأ مماثلا لجين مُسْتَزرع فى بلازميد ،وفى هذه الحالة تصبح الخلية البكتيرية حاملة للشظية المستزرعة إلى الأبد . وبناء على ذلك فإنّ كلا من البلازميدات والفاجات يمكن استعماله فى إيلاج الجينات الغريبة فى الخلايا البكتيرية .

الناقلات الفاجية : Phage Vectors

إنّ نجاح دور البلازميدات فى بحوث الد ن أ المطعم قد أدّى ايضا إلى استعمال الفاجات المعتدلة temperate كناقلات ،حيث أنّ الكثير من هذه الفاجات قد أظهر مقدرته ليعمل كعوامل استنقال (transducers) بين بكتريات واهبة ومستقبلة . ففى الفاج لامبدا (λ) ،قد يحل الد ن أ



شكل (١٤-١٣) : تكوين الليسوجين (a lysogen) .

(١) يَحْقن الفاج لامبدا الدنا الخاص به فى الخلية البكتيرية من خلال الجدار الخلوى ، ويكون جزئ الدنا المحقون له نهايات لزجة (sticky ends) .

(٢) يتبدّل الدنا الى الشكل الدائرى .

(٣) يحدث التحام ligation للأطراف اللزجة . وعند هذه النقطة يكون هناك اختياران للفاج : إما أنه يناسخ الدنا الخاص به معطيا نسلا فاجيا ويقتل البكتريم ، والاختيار البديل هو أنه يولج الدنا الخاص به فى الدنا البكتيرى (٤-٦) ويبقى ساكنا لعدد غير محدود من الأجيال البكتيرية . ويلاحظ أنّ كلا من البروتينات الفاجية والبكتيرية تلعب أدوارا هامة فى عملية الايلاج .

البكتيرى محل حوالى $\frac{1}{3}$ الـ د ن أ الخاص بلامبدا فى مقطع الحشو stuffer للفاج λ) ، وهو مابين الجينين J و N فى الخريطة الارتباطية للفاج (انظر الشكل ١٤ ـ ١٤) . وبالرغم من ذلك يظل الفاج يمكنه التكاثر فى الخلية المضيفة ويسبب التحلل . وهذه المقدرة على دمج كمية كبيرة من الـ د ن أ الغريب (حوالى ١٥ ــ ٢٠ كيلو زوج /قواعد) توفر ميزة عن البلازميدات حيث تكون فيها إيلاجات طويلة من الـ د ن أ عرضة للتناقص التدريجى فى الحجم ، وذلك لأنّ ظروف التنافس التكاثرى تشجع الانتخاب لانتقاصات قدتثمر بلازميدات أصغر فى الحجم . وعلاوة على ذلك ، فإنّ صَرَّ الـ د ن أ فى الرؤوس heads الفيروسة يعتمد ــ من بين عديد من العوامل ــ على حجمه ، حيث أنّ أطوالا من الـ د ن أ أكبر من ١٠٥ ٪ أو أقل من ٧٨ ٪ من الطاقم الجينى العادى للفاج لامبدا (λ) يصعب صَرُّها فى رأس الفاج . وقد يعنى هذا أنّ الاستبعاد التجريبى لمقطع الحشو المركزى للكروموسوم الفاجى سوف يسمح بمقطع د ن أ يكون قصيرا جدا للصَّر (فقط حوالى ٦٠ ٪ من الطول العادى) مالم يمكن إيلاج طول مناسب من الـ د ن أ الغريب فى مكانه . لذلك فإنّ الانتخاب لحجم الصَرّ يساعد على التأكد من تكوين د ن أ فاجى مُطَعَّم ، وحالما يتم إيلاج الـ د ن أ الغريب فى الفاج لامبدا (λ) ، فإنّ نفس العملية الانتخابية تساعد أيضا على منع فقده أثناء الاستزراع . وكذلك تدخل الجسيمات الفيروسية إلى الخلايا بسهولة كبيرة جدا عن البلازميدات . ولقد أمكن إيضاح أنّ بعض العمليات يمكنها أن تكوّن حوالى 10^8 من البقع plaques البكتيرية الملوثة بالفاج من كمية تقدر بحوالى ١ ٠٠٠٠ر٠ جرام من د ن أ الفاج .

خصائص الناقل الفاجى :

ومن بين الخصائص الهامة للناقل الفاجى شائع الاستعمال ، شارون 4A (Charon 4A) هو وجود طفرتين "كهرمانى Amber " عديمتى المعنى

فى الجينين A و B تمنعان الفاج من التكاثر فى سلالات إ ٠كولاى التى لاتحمل الطفرة عديمة المعنى الشبطة المناسبة ٠ وهذا بالضرورة يُحَدِّد نمووانتشار الفاجات ذات الد ن أ المطعم غير المرغوبة خارج المختبر ٠ وبالاضافة لذلك فان الناقل الفاجى " شارون 4A" يحمل جينا lac^+ من إ ٠كولاى كمقطع من شَظِيّة الحشو الداخلية الخاصة به ،ومن ثمّ فعندما تُستَبدل شظية الحشو بمقطعٍ من د ن أ غريب ،فإنّ نُموّ الفاج λ فى سلالات إ ٠كولاى lac^- سوف ينتج بُقَعاً plaques ذات طراز مظهرى lac^- وليس ذات طراز مظهرى lac^+.

(توجد بيئة خاصة تسمى Xgal ،تحتوى صبغة كَشّافة عديمة اللون عند ما تكون الخلايا البكتيرية lac^- ،وتتحوّل إلى اللون الازرق الداكن عند ما تكون الخلايا lac^+) ٠ وكما يتضح فى الشكل (١٤ـ١٤) يوجد موقعان لانزيم القطع المتخصص EcoRI على الناقل الفاجى (شارون 4A) ،أحدهما يقع داخل الجين lac والآخر يقع على بعد حوالى ١٥ كيلو قاعدة ناحية الطرف الأيمن للفاج ٠ وتسمح إزالة شظية الحشو للد ن أ الفاجى بأن يُصَرّ فى الرؤوس الفيروسية فقط إذا شمل إيلاجة من الد ن أ الغريب بحد أدنى فى الطول قدرها ٧ كيلو زوج من القواعد وبحد أقصى قدره ٣٠ كيلو زوج من القواعد ٠

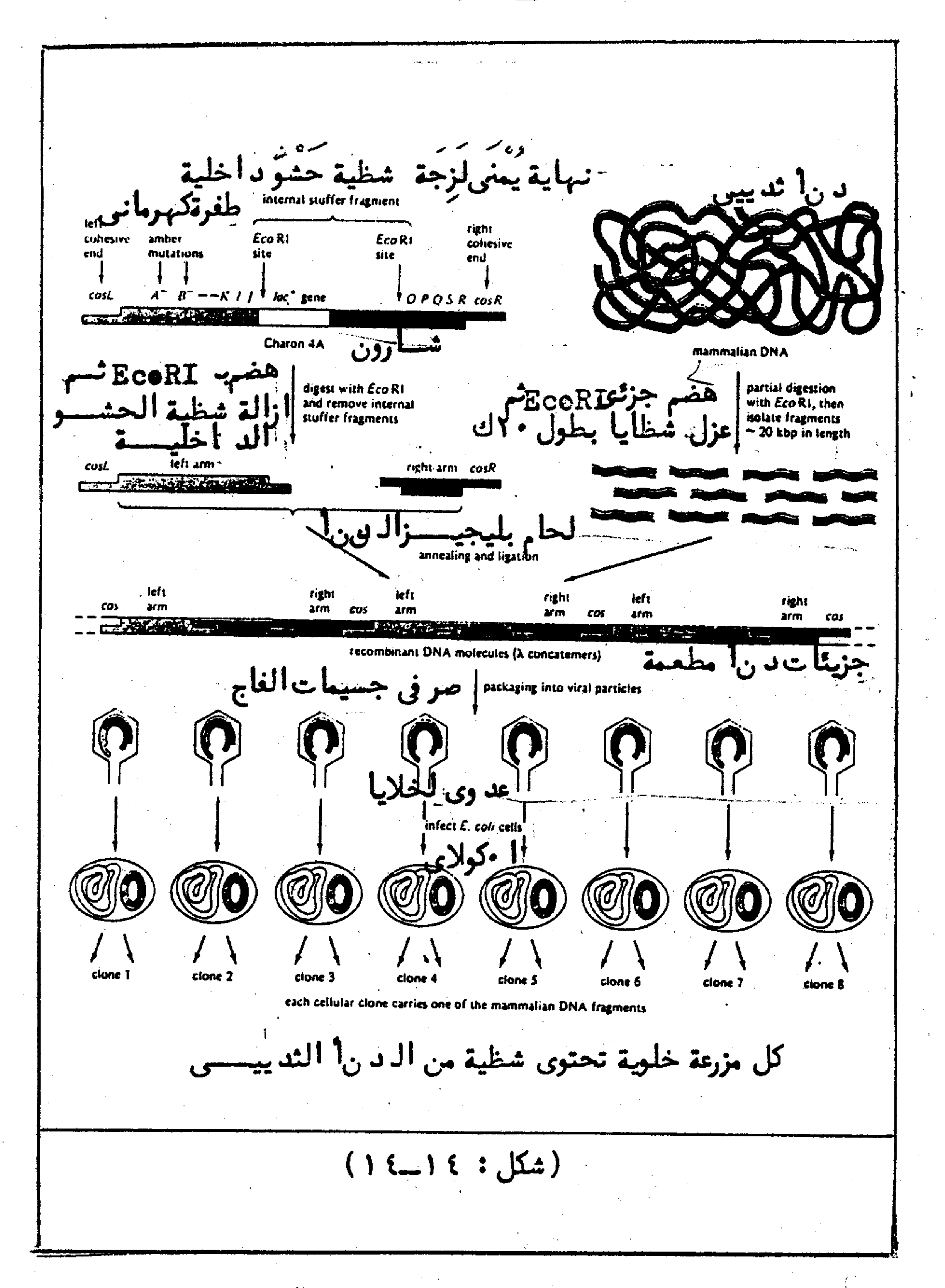
مكتبات الد ن أ (أو بنوك الجينات) : DNA Libraries (Gene Banks)

يمكن تعريف مكتبة الد ن أ بأنها مجموعة من شظايا الد ن أ تُمثّل مع بعضها كل الطاقم الجينى entire genome لكائن ما،ويحتفظ بها فى مجموعة من جسيمات ناقل فاجى phage vector ،حيث تُستَعمل كل شظية محددة منها فى استزراع جين أو جينات معينة عند إجراء تجارب الاستزراع الجينى ٠

لقد وفرت الناقلات الفاجية ـ مثل الفاج لامبدا (λ) ـ ميزة دمج شظايا كبيرة نسبيا من الد ن أ الغريب فى محتواها من الد ن أ ٠ ولقد استعملت هذه

دليل الشـــكل (١٤ـ١٤) :

استعمال الناقل الفاجي لامبدا (λ) ـ شارون A4 في تكويـــن مكتبة من تتابعات الدنا من طاقم جيني ثدييي • تزال شظية الحشـــو stuffer fragment من الفاج لامبدا (λ) تاركة أذرعا ناحيـــة الشمال واليمين تحمل مواقع قابلة للالتحام (cos) في كل طرف• وعندما تُلحَم هذه الأطراف مع دنا ثدييي تتكون مقاطع طويلة • يمكن بعد ذلـــك تقطيعها في المواقع cos وتُصَرّ في جسيمات فاجية تتوافر بواسطة سلالات أُخَر من الفاج لامبدا (λ) • بعد ذلك تستعمل هذه الفاجات المطعمة في عدوى سلالات من بكتيريا إ • كولاي (lac^- حاملة لجين كهرماني مثبط). ويترتب على ذلك تكوين مكتبة من كلونات الدنا المطعم • إن استعمـــال المواقع cos كوسيلة لِصَرّ الدنا في جسيمات فاجية أدى الى تشييد مـــا يسمى بالكوزميدات cosmids وهي عبارة عن بلازميدات صغيرة تحمـــل مواقع لامبدا كوس ، وهذه يمكن إضافتها إلى ناقلات . الفاج لامبدا • ولمـــا كانت الكوزميدات قد لا تحتوي على جينات الفاج لامبدا ـ غير الموقع cos ، كما أن مقاطعها البلازميدية صغيرة (تحتوي فقط على واسم واحد مقاوم وآخر لاستهلال التناسخ) ،لذلك يمكنها أن تُصَرّ شظايا اكبر من الـدنا في الجسيمات الفاجية قد تصل إلى ما بين ٣٥ ـ ٤٥ كيلو / زوج قواعـــد •



نهاية يمنى لزجة شظية حشو داخلية
د ن أ ثدييى
طفرة كهرمانى
internal stuffer fragment
left cohesive end
amber mutations
EcoRI site
EcoRI site
right cohesive end
cosL
lac⁺ gene
O P Q S R cosR
Charon 4A
شارون
mammalian DNA
هضم EcoRI ثم ازالة شظية الحشو الداخلية
digest with EcoRI and remove internal stuffer fragments
هضم جزئى EcoRI ثم عزل شظايا بطول ٢٠ك
partial digestion with EcoRI, then isolate fragments ~ 20 kbp in length
cosL
left arm
right arm
cosR
لحام بليجيز الدنا
annealing and ligation
cos
left arm
right arm
recombinant DNA molecules (λ concatemers)
جزيئات د ن أ مطعمة
صر فى جسيمات الفاج
packaging into viral particles
عدوى للخلايا
infect E. coli cells
اكولاى
clone 1
clone 2
clone 3
clone 4
clone 5
clone 6
clone 7
clone 8
each cellular clone carries one of the mammalian DNA fragments
كل مزرعة خلوية تحتوى شظية من الد ن أ الثدييى

(شكل : ١٤ـ١٤)

الفاجات فى تشييد "مكتبات د نأ "أو "مَصارِف جينات "يستزرع فيها الـ د نأ الكلى لكائن ما • ففى الانسان -على سبيل المثال -أمكن صَرُّ packaging كل الـ د نأ الخاص به فى مكتبة د نأ قوامها حوالى من 10^5 إلى 10^6 وحدة من الجسيمات الفاجية ،ويمكن تلخيص التكنيك المستعمل فى تشييد مكتبة د نأ فى الخطوات التالية (أنظر الشكل ١٤-٤١) :

(١) يُقَطَّع الـ د نأ الغريب للطاقم الجينى للكائن إلى شظايا تتراوح أطوالها مابين ١٥-٢٠ كيلو/زوج قواعد (Kbp) ،إما بالتجريد الميكانيكى أو باستخدام إنزيمات التحديد المتخصصة • .

(٢) تُسْتَبْعَد "شظية الحشو stuffer fragment "من ناقل فاجى مثل الناقل شارون 4A (Charon 4A) والمُشَيَّد اصطناعيا من الفاج لامبدا . (Lambda, λ)

(٣) تُلْحَم شظايا الـ د نأ الغريب فى د نأ الناقل الفاجى باستعمال إنزيم لحام الـ د نأ DNA ligase .

(٤) يتم إجراء عدوى اصطناعية لسلالة مناسبة من بكتريا إ •كولاى بالفاجات المُطَعَّمة بالـ د نأ الغريب ،حيث يترتب على ذلك تَكَوّن رصيد ضخم من خلايا بكتيرية حاملة لكل الطاقم الجينى فى صورة شظايا من الـ د نأ الغريب فى حالة مستديمة (الشكل ١٤-٤١) •

ويمثل هذا النوع من التجارب العشوائية (shotgun) تَنَوّعا كبيرا من شظايا الـ د نأ العشوائية ،والتى يمكن منها بعد ذلك انتخاب كلونات (مستنبتات) وتمييزها ،ثم الاحتفاظ بها داخل أنابيب اختبار لحين استعمالها فى تجارب الهندسة الوراثية •

طرق التعرف على شظايا الد ن أ المسترزعة : (مسابر الد ن أ DNA probes)

تساعد المعلومات المتوفرة من معرفة عملية ضبط إيقاع وتعبير الجين وكذلك ميكانيكية تناسخ الد ن أ ـ والتي سبق ذكرها فى أبواب سابقة ـ على إضافة تفاصيل هامة للاستراتيجية العامة للاستزراع الجينى • فبادئ ذى بدء، يُقَطَّع الد ن أ عند بالندرومات مُحَدَّدَة بواسطة إنزيم تحديد مُنَقّى ، إلى شظايا وهذه تُلْصَق فى ناقلات استزراع باستعمال إنزيم ليجيز الد ن أ • وكلا الانزيمين يمكن فصله وتنقيته فى المختبر (أنظر طريقة استخلاص الانزيمات من الخلايا الحية فى جزء لاحق) ، كما يمكن الحصول عليه تجاريا • بعد ذلك تحمل الناقلات مقاطع الد ن أ الى خلايا بكتيرية مضيفة والتى تنمى فى مستنبتات منفصلة على آجار فى أطباق بترى • وتوجد عدة تقنيات تستعمل فى التعرف على شظايا الد ن أ المناسبة ، وتسمى مَسَابِر (مَجَسَّات) الد ن أ DNA probes.

وتعتمد هذه التقنيات على تهجين الأحماض النووية Nucleic acid hybridization.

أولا : تكنيك تهجين الكلون : Colony Hybridization

يستعمل فى هذا التكنيك مزرعة رئيسية Master plate لعدد من المستنبتات (الكلونات) البكتيرية أو بقع الفاجات (الشكل ١٤ـ ١٥ أ) •

(١) يُكَرَّر تفريد الكلون أو البقعة الفاجية على مُرشّح من مادة النيتروسليولوز •

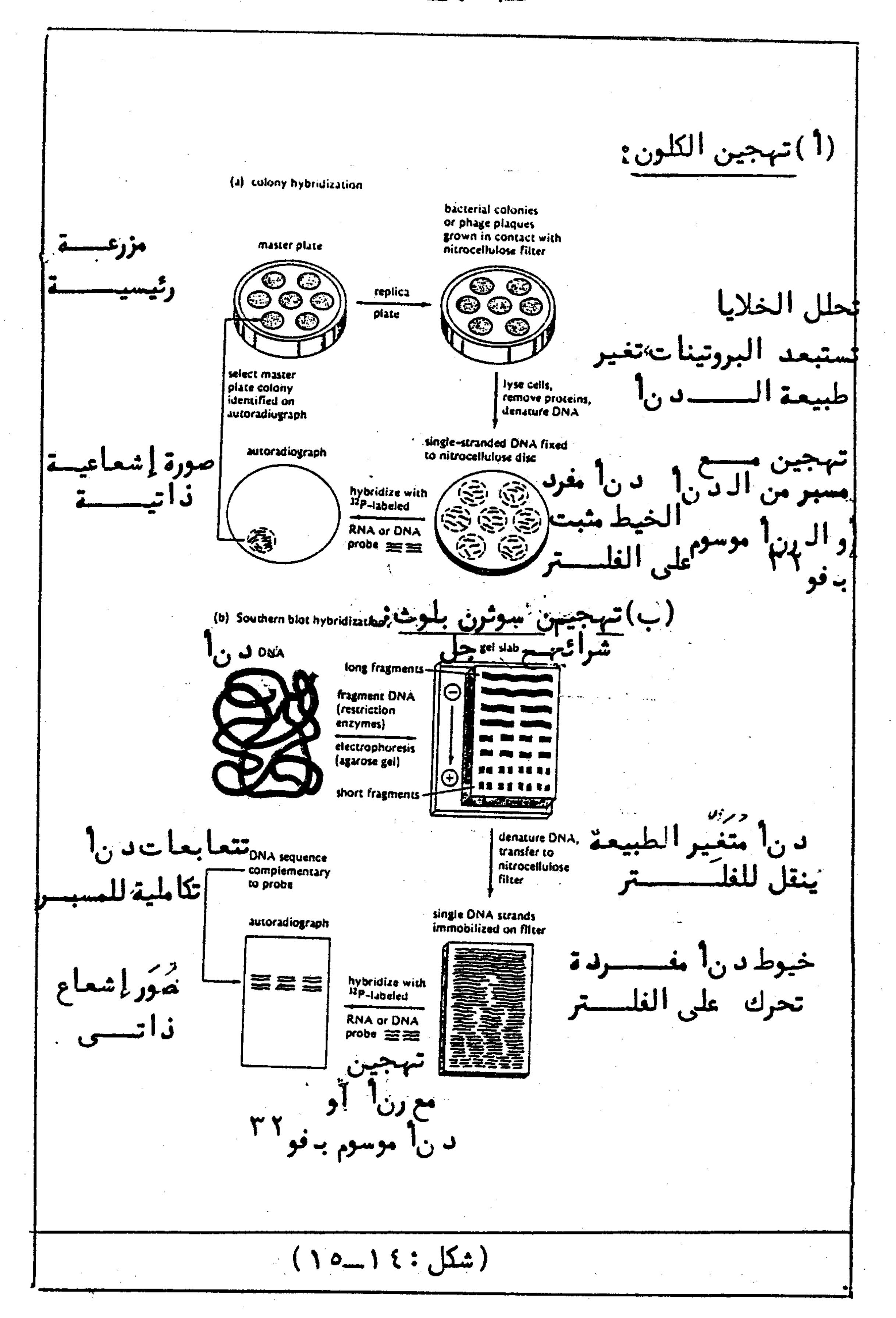
(٢) تُغَيَّر طبيعة الد ن أ لكل كلون بكتيرى أو بقعة فاجية بحيث يتحول الد ن أ إلى خيوط فردية •

(٣) تُثَبَّت خيوط الد ن أ المفردة على المرشح النيتروسليولوزى •

(٤) تُهَجَّن هذه الخيوط مع مسابر (مجسات) probes من الر ن أ أو الد ن أ مَوْسُومَة إشعاعيا على أساس قاعدة واطسون ـ كريك لتزاوج القواعد التكاملى •

دليل الشكل (١٤—١٥) :

التقنيات المستعملة فى عزل مجموعات (clones) من شظايا د ن أ حاملة لتتابعات نوتيدية مرغوبة . (أ) صورة ذاتية الاشعاع (auto-radiograph) ناتجة من تهجين مِسْبَر probe من الد ن أ او الرن أ المشع مع خيوط مفردة من د ن أ مثبتة على قرص من مادة النيتروسليولوز ، والذى يسمح بتسكين المجموعة (الكلون clone) المرغوبة على الطبق الرئيسى master plate . (ب) يُقطَّع د ن أ مأخوذ من طاقم جينى أو مُسْتَزرع ثم يُفَرَّد إلكتروفوريا على جل (gel) يُسَكِّن كل شظية من الد ن أ طبقا لحجمها ، ويصبغ الجل بصبغة بروميد الاثيديوم (ethid.bromide) لاظهار الد ن أ . ويفكك الد ن أ الى خيوط مفردة باستعمال قلوى . ثم يوضع فِلْتَر من النيتروسليولوز مثبت فى خلفيته ورق مُثَبِّت (blotting paper) يوضع على قمة الجل ، وهو يتصيد جزيئات الد ن أ والتى يمكن تهجينها مع مِسْبَر مشع (radioactive probe) . ومعرفة الموقع الذى تتجمع عنده شظايا الد ن أ المُهَجَّن فى الجِلّ يسمح بالحصول على شظايا د ن أ مزدوجة الخيط المقابلة من جل لم تُغَيَّر فيه طبيعة الد ن أ . ويستعمل نوع من الفلتر مختلف بعض الشئ لفصل الد رن أ من الاجاروز ، وهو يسمى بتهجين "نورثرن بلوت" (Northern blot hybridi-zation). وتفاصيل هذه التقنيات وغيرها من تقنيات التداول الجينى موصوفة بالتفصيل فى مراجع الهندسة الوراثية .


(أ) تهجين الكلون:
(a) colony hybridization
master plate
مزرعة رئيسية
replica plate
bacterial colonies or phage plaques grown in contact with nitrocellulose filter
تحلل الخلايا
تستبعد البروتينات، تغير طبيعة الـ د ن أ
lyse cells, remove proteins, denature DNA
select master plate colony identified on autoradiograph
autoradiograph
صورة إشعاعية ذاتية
single-stranded DNA fixed to nitrocellulose disc
hybridize with ³²P-labeled RNA or DNA probe
تهجين مع مسبر من الـ د ن أ أو الـ ر ن أ موسوم بـ فو ٣٢
د ن أ مفرد الخيط مثبت على الفلتر
(b) Southern blot hybridization
(ب) تهجين سوثرن بلوت
DNA
د ن أ
gel slab
شرائح جل
long fragments
fragment DNA (restriction enzymes)
electrophoresis (agarose gel)
short fragments
denature DNA, transfer to nitrocellulose filter
د ن أ متغير الطبيعة ينقل للفلتر
single DNA strands immobilized on filter
خيوط د ن أ مفردة تحرك على الفلتر
DNA sequence complementary to probe
تتابعات د ن أ تكاملية للمسبر
autoradiograph
صور إشعاع ذاتي
hybridize with ³²P-labeled RNA or DNA probe
تهجين مع ر ن أ أو د ن أ موسوم بـ فو ٣٢

(شكل: ١٤ـ١٥)

(٥) يستعمل تكنيك التصوير الاشعاعى الذاتى autoradiography فى تمييز المستبنات التى تحمل تتابعات الد ن أ التكاملية لتتابع المِسْبر المشع.

ويسمح هذا التكنيك بعزل أكبر عدد من شظايا الد ن أ المناسبة والمرغوبة.

ثانيا: تكنيك ساوثرن بلوت : Southern Blot Technique

هذا التكنيك شائع الاستعمال فى الكثير من تجارب الهندسة الوراثية ويمكن تلخيصه فى الخطوات التالية (الشكل ١٤ - ١٥ب):

(١) تُسَكَّن تتابعات مرغوبة من الد ن أ فيما بين مجموعة من شظايا الد ن أ التى سبق فصلها على جِلّ الاجُاروز agarose gel من خلال عملية التفريد الكهربى المتدرج Electrophoretic gradient للـ د ن أ.

(٢) تُغَيَّر طبيعة الد ن أ فى جِلّ الاجُاروز إلى خيوط مفردة.

(٣) تُنقَل خيوط الد ن أ المفردة على مرشح (filter) مِن مادة النيتروسليولوز.

(٤) تُهَجَّن هذه الخيوط المفردة من الد ن أ ssDNA مع خيوط تكاملية من د ن أ أو رن أ موسومة إشعاعيا.

(٥) تؤخذ صور إشعاعية ذاتية autoradiographs لتحديد موقع الشريط (أو الشرائط) الخاص بشظايا الد ن أ المكملة للمسبر الموسوم إشعاعيا.

(٦) قد يُعْزَل هذا الد ن أ الذى تم تحديده مِسْبَريًا وذلك على مواقع متطابقة على جِلَّات أجاروز غير معاملة جُهِّزت فى وقت متزامن مع التجربة المسبرية لاستخدامه فى التجارب المختلفة.

ومن خلال تكنيكات تهجين الاحماض النووية هذه، أمكن الآن تمييز العديد من الجينات، ثم بعد ذلك توصيفها إما بواسطة توقيع خرائط إنزيمات التحديد

restriction enzyme maps ،أو تحديد تتابعاتها النوتيدية sequencing أو كليهما معا ٠

ثالثا : تكنيك التهجين فى موضعه : In situ hybridization

يستعمل هذا التكنيك فى الدروسوفلا وغيرها من الكائنات التى بها كروموسومات بوليتينية (عملاقية) Polytene or Giant ،حيث يمكن تَسْكِين مقاطع محددة من الدنأ المسترزع (cDNA) فى شرائط كروموسومية معينة بواسطة التهجين فى موضعه in situ hybridiz. ويقصد بذلك أنّ شظية دنأ مسترزع (cDNA) مأخوذة من مكتبة ما أو من بنك جينات يتم وَسْمها إشعاعيا ،ثم بعد ذلك تُغَيَّر طبيعتها إلى خيوط مفردة وتستعمل كمِسْبَر probe لتُهَجَّن مع تحضيرات سيتولوجية من دنأ مُتَغَيِّر الطبيعة (مفرد الخيط ssDNA)معزول من الكروموسومات البوليتينية ويتم ذلك على شريحة ميكروسكوبية٠ ثم بعد ذلك تؤخذ صور إشعاعية autoradiographs لهذا التهجين فى موضعه in situ حيث تظهر حبيبات فيلمية واضحة على تلك الشرائط الكروموسومية والتى تحتوى على تتابعات دنأ تكاملية لتلك التى فى المِسْبَر المشع٠

وحيث أنّ كثيرا من المواقع الجينية فى حشرة الدروسوفلا قد تم تحديد أماكنها بمنتهى الدقة فى شرائط كروموسومية بوليتينية معينة ،فإنّ هذا التكنيك السهل قد وفَّر سُبلا جيدة لتحديد تتابعات الدنأ لجينات معروف مواقعها ، وإن كانت نواتج هذه الجينات غير معروفة٠ فعلى سبيل المثال ،يوجد "تجمع جينى gene complex "يسيطر على التجويف ثنائى الصور bithorax فى الدروسوفيلا ميلانوجاستر قد سُكِّن وراثيا فى الشرائط الاربعة داخل المقطع رقم ٨٦ فى الكروموسوم الثالث٠ وقد تمكن العالم

بِنْدَر Bender ومعاونوه من بيان أن مقطعا من د ن أ الد روسوفلا المسترزع كان قابلا للتهجين مع مقطع كروموسومى مجاور لهذه الشرائط • وبتكرار هذه العملية فقد تم تشييد مكتبة د ن أ لحشرة الد روسوفلا شملت حوالى ٢٠٠ كيلو زوج من القواعد على طول هذا الكروموسوم من موقع التجمع الجينى ثنائى الصدر Bithorax gene complex.

رابعا : تخليق مسابر د ن أ بواسطة إنزيم النسخ العكسى :

DNA probes synthesized through reverse transcriptase

يمكن الحصول على مسابر رن أ نشطة إشعاعيا بعزل م • رن أ مُسْتَنْسَخ من الجين المرغوب استزراعه ، وذلك بتنمية الخلايا فى وجود نوتيدات موسومة إشعاعيا. وعلى الرغم من ذلك ، فغالبا مايكون من الصعب الحصول على م • رن أ طبيعى يحتوى على كمية كافية من النشاط الاشعاعى لاختبار المستنبتات البكتيرية للجينات المسترزعة ، وذلك لأن الأمر يتطلب إضافة زيادة فى النشاط الاشعاعى للخلايا لدرجة أنها قد تموت • ويترتب على ذلك أن يستخدم هذا الم • رن أ عادة كقالب template لتخليق د ن أ باستعمال إنزيم النسخ العكسى ، وهو إنزيم يستخلص وينقى من رن أ فيروسات الأورام tumor viruses • ولما كان هذا الد ن أ الناتج يتكون فى أنبوب الاختبار ، فانه يمكن جعله عالى النشاط الاشعاعى باستعمال نوتيدات موسومة اشعاعيا أثناء تخليقه •

خامسا : التخليق الاصطناعى لمسابر الد ن أ :

Artificial synthesis of DNA probes

توجد طريقة عامة للحصول على مَجَسَّات (مسابر) د ن أ بطريقة اصطناعية

يمكن تلخيصها فى النقاط التاليـــــة :

(١) يفصل ويُنَقَّى الناتج البروتينى للجين تحت الدراســـة .

(٢) يتم تحديد تتابعات الأحماض الأمينية لهذا البروتين بالتحليل الكيميائى .

(٣) لما كان كلُّ حمض أمينى مُشَفَّرله بوحدة ثلاثية من النوتيدات فى مقطـــع د ن أ الجين ، فمن الممكن استنتاج التتابع النوتيدى للجين من تتابـــع الأحماض الأمينية لبروتينه (قد لايكون الاستنتاج مضبوطا لأنّ معظم الأحماض الأمينية مُشَفَّر لهـا بأكثر من كودون مختلف، (أنظر مرونة الشفرة الوراثية ـــ الباب ١١) .

(٤) تشمل الخطوة الأخيرة التخليق الكيميائى لمقطع قصير من الد ن أ ، قاعدة واحدة فى كل مرة ،بتتابع متطابق تماما لتتابع الجيـن المرغـــوب الذى تم استنساخـــــه .

ويجدر الذكر أنه تتوفر ـــ فى الوقت الحاضر ـــ أجهزة حديثة لتحديـــد تتابعات الأحماض الأمينية Amino acid sequencers ،كما تـــم اكتشاف إنزيم نقى يسمى "إنزيم الكينيز Kinase " يستعمل لاضافـــة الفوسفور المشعـ فو ٣٢ ـ لمقاطع الد ن أ المُخَلَّقة اصطناعيا ،مما يجعلهـــا مَسابر عالية النشاط الاشعاعـــى . ويتم ذلك فى أجهزة تخليق الد ن أ ذى المقاطع القصيرة داخـــل المختبـــر . DNA Synthesizers .

تقنيات الهندسة الوراثية وآفاق المستقبل لصور الحياة ورفاهية الجنس البشرى :

وفّرت تقنيات الهندسة الوراثية والـــتى تشمـــل :

(١) استعمالات إنزيمات التحديد المتخصصة restriction enzymes فى مجالات واسعـــة .

(٢) استعمالات الناقلات vectors البلازميدية والفاجيـــــة .

(٣) مَسابِر (مَجسّات الدنأ) DNA probes .

(٤) تكنيكات عزل وتنقية الدنأ والرنأ .

(٥) طـرق تحديد التتابعات النوتيدية لمقاطع الدنأ
DNA sequencing methods.

كل هذه التقنيات وغيرها من التكنيكات الفيزيائية والكيميحيويـــة الحديثة ،قد وفّرت وسائل تكنيكية متعددة لتحليل وإعادة تشييد الأجهــزة الوراثية لمختلف أنواع الكائنات الحية ،وذلك بطرق تَبْدُو جديدة ومثيرة بمــرور الزمن ،وسوف نعرض فيمايلي مُوجَزاً لما تحقق وما يتوقع تحقيقه في المستقبل القريب:

(١) منذ حوالي عام ١٩٨٠ ،تمكن علماء الهندسة الوراثية من تخليق هرمون الانسولين الآدمي وهيموجلوبين الدم وغيرهما من البروتينات الهامة ،علـــى مستوى تجاري - في مصانع حيوية بكتيرية (أنظر التطبيقات العملية لتكنولوجيـا الهندسة الوراثية - الباب ١٦ من هذا المرجـــع) .

(٢) أمكن توقيع خرائط للجينات الآدمية وغيرها من الكائنات الحية ،بواسطـة تهجينات الدنأ المسترزع cDNA والمستخلص من مكتبات أو بنوك الجينات الخاصة بمواقع وراثية محـــددة .

(٣) أمكن استخدام أسلاف الفاجات retroviruses (فاجات الرنأ) كناقلات لتحِلّ محل جينات في خلايا آدمية (أو حيوانية) منقوصة وراثيـــا ، وذلك باستخدام تكنيكات مزارع الخلايا الحيوانية Animal cell culture).

(٤) أمكن استخدام الناقلات البلازميدية المشتقة من خلايا أورام التـــدرن التاجـــي (Crown gall tumors) بكفاءة عالية جدا لتحريك ونقـــل الجينات الهامة بين الخلايا النباتية المختلفـــة .

(٥) أصبح من الممكن الآن - باستخدام تقنيات الدنأ المطعم - تحديـــد الطفرات التي تشمل انتقاصات أو إيلاجات أو استبدالات للقواعد لتُسكّن فـــي

أماكن محددة من الدن أ المسترزع ،وتحديد أماكنها بمنتهى الدقة ،كوسيلة لتشخيص أمراض النقص الوراثية قبل الولادة prenatal diagnosis (أنظر خرائط التحديد restriction maps ـ الباب ١٥) .

إنّ هذه الاكتشافات المثيرة والمذهلة وغيرها مما سيأتى به المستقبل القريب لها ضمنيات علمية وعملية واجتماعية واسعة النطاق بالنسبة لصور الحياة على ظهر الأرض. وفى هذا المجال فإنّ تفهمنا لطبيعة الحياة على مستوى التركيب الكيميائى والجزيئى لمادة الحياة ،وعلى مستوى البروتين المُخَلَّق اصطناعيا ،قد أدى إلى إمكانية تداول الحياة فى الانبوب in vitro داخل المختبر .

الأخطار المحتملة وراء استخدامات تكنولوجيا الهندسة الوراثية :

حقيقة إنّ العلم سلاح ذو حدين ،فبالرغم من الاكتشافات المثيرة ـ التى عرضنا موجزا لها فى الجزء السابق ـ إلاّ أنّ علماء الوراثة الذين لهم دور رائد فى هذا المجال ـ قد حذّروا منذ عام ١٩٧٤ من الأخطار الكامنة والمحتملة لمعالجة وتناول المادة الوراثية فى الأنبوب . وفيمايلى موجز لمثل هذه الأخطار :

(١) قد تنتقل بعض الجينات الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية الى كائنات بكتيرية ممرضة pathogenic bacteria ،لم تكن فى الماضى مقاومة لهذه المضادات ،وقد يترتب على ذلك انتشار الكثير من الأمراض الوبائية (أنظر البلازميدات والصحة العامة ـ الباب ٤) .

(٢) قد تنتقل بعض الجينات المسئولة عن إنتاج بعض السموم (toxins)

إلى كائنات بكتيرية ،لم تكن في العادة مسببة لأمراض ،مما يضيف إلى البيئة التي نعيش فيها كائنات جديدة على مستوى عالٍ من الخطورة .

(٣) إدخال د ن أ من فيروسات مسببة للأمراض في فيروسات أُخَر ،أو في بلازميدات مُشَيَّدة اصطناعيا ،كذلك الموجودة في بكتريات القولون (إ.كولاي) في الآدميين والكائنات الحيوانية الأُخَر ،قد يترتب عليه زيادة معدلات الاصابة بالأورام السرطانية ،أو تخليق فيروسات خطيرة بالنسبة للانسان (يحتمل أن يكون فيروس مرض الإيدز Aquired Immuno Deficiency Syndrome أحد هذه الكائنات الناتجة من تقنيات الد ن أ المطعم) .

(٤) إنّ وصل د ن أ من كائنات ميزات النوى eukaryotic DNA في مقاطع من د ن أ بلازميدي أو فيروسي (مكتبات الد ن أ) بهدف استزراعها في بكتريات إ.كولاي أو ب.ستلس أو غيرها ،أو استخدامها في العلاج الجيني Gene therapy ،قد يؤدي إلى تكوين تتابعات د ن أ جديدة مماثلة لتتابعات د ن أ أسلاف فيروسية مشابهة لفيروسات الر ن أ المسببة للأورام السرطانية .

(٥) يتخَوَّف كثير من علماء البيولوجيا من أنّ بعض التجارب قد تُصَمَّم بهدف تسعى إليه بعض الحكومات لاستخدام تكنولوجيا الد ن أ المطعم لزيادة التأثير المميت لأسلحة الحرب البيولوجية Biological warfare.

ولقد أدَّت هذه المخاوف المحتملة إلى وضع ضوابط للأمان الوراثي منذ عام ١٩٧٥ ،شملت:

(أ) تشييد ناقلات vectors وخلايا استزراع لايمكنها المعيشة خارج نطاق البيئة المعملية ،مثل سلالة البكتريا إ.كولاي K12.

(ب) حظر إجراء بعض التجارب التي تمثل خطورة على الجنس البشري .

ولحسن الحظ لم يتحقق — حتى وقتنا الحاضر — أيّ من هـــذه المخاوف الخاصة ببحوث الـ دنا المُطَعَّم . وقد ترتب على ذلك أن الضوابط التى تم وضعها للحد من هذه البحوث قد تضاءلت كثيرا . ويمكن القـول أنّ مجالات البحوث فى تناول المادة الوراثية فى الأنبوب يتّسع بسرعة فائقـة ليدخل فى الاستثمارات المكثفة فى المجالات الطبية والدوائية والزراعيـة ومكافحة التلوث البيئى وغيرهـا .

المـــراجع:

- Plasmids of Eukaryotes, by:K.Esser et al.(1986), Springer - Verlag, Berlin , Heidelberg,New York.
- Genetic Engineering in Higher Organisms, by: J. Roger Warr (1984), Edward Arnold, London.
- Genetics, 3rd ed., by: M.W. Strickberger (1985), Macmillan, New York.
- Genetics, 3rd ed., by: Ursula Goodenough (1984), Holt-Saunders, New York.
- Understanding DNA and Gene Cloning, By:Karl Drlica (1984), John Wiley, New York.
- Genes III (3rd)ed.), by :Benjamin Lewin (1987), John Wiley & Sons, New York.

مراجع باللغة العربية ينصح بقراءتها :

- صناعة الحياة ، تأليف: إدوارد يوكسين ، ترجمة : د . أحمد مستجير (١٩٨٥) - الناشر : مكتبة غريب - القاهرة .

- طبيعة الحياة ، تأليف : فرانسيس كريك ، ترجمة : د . أحمد مستجير (١٩٨٨) - الناشر : عالم المعرفة - الكويت .

- الوراثة ، تأليف: أورسولا جودينف ، ترجمة : د . هاشم حسين و د . أحمد الشرقاوى (١٩٨٢) - الناشر - : مركز الأهرام للترجمة والنشر - شارع الجلاء - القاهرة

الباب الخامس عشر

التطبيقات العلمية لتقنيات الهندسة الوراثية

مقدمة :

وفّرت تقنيات الهندسة الوراثية سُبُلا كفوءة وغاية فى القوة للحصول على كميات وفيرة من مقاطع محددة من الدنأ الخاص بأى كائن ، وذلك لدراسة وتحليل تركيب الجينات ووظائفها . كما أنّ الاستعمالات المتنوعة لانزيمات التحديد restriction enzymes قد أفادت فى كشف الكثير من أسرار المادة الوراثية وكيفية السيطرة عليها ، كما أنها طُوّعت لرسم خرائط التحديد (restriction maps) لجزيئات الدنأ المستخلصة من مختلف الكائنات . وسوف نعرض فيما يلى بعضا من التطبيقات العلمية لهذه التقنيات .

(١) تحليل التركيب الجزيئى للجين : Analysis of Gene Molecular Structure

كما هو معروف يتركب الجين من تتابع محدد من آلاف النوتيدات الأربع المعروفة (وهى A و T و C و G) يقع ضمن تتابع طويل جداً لجزىء دنأ يشمل عددا غير محدود من الجينات الواقعة فى نفس الجزىء (الكروموسوم) . ولكشف التتابع السليم لآلاف من وحدات القواعد ، يتطلب الأمر خبرة عالية لعدد من التقنيات الجزيئية التى عرضناها فى البابين ١٣ و ١٤ . ويشمل تحليل تركيب الجين عدة خطوات هى :

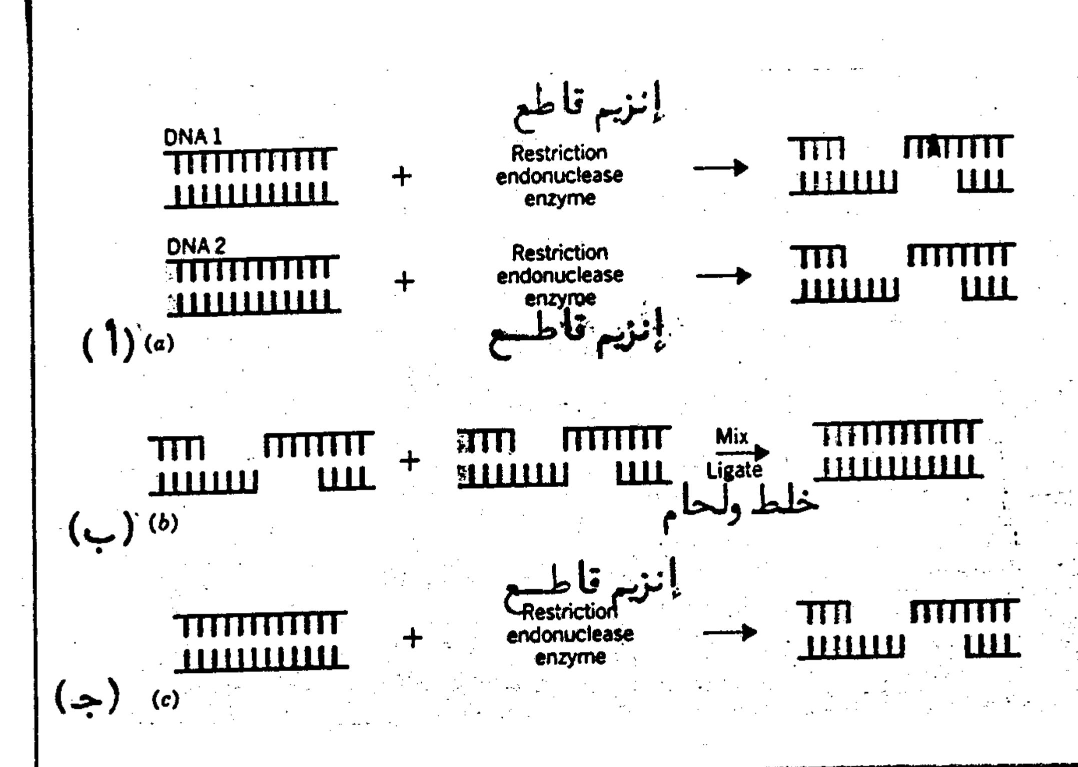
أولا : تحديد التتابع النوتيدى لمقطع الدنأ المكوّن للجين . فكما هو معروف يعنى استزراع جين ما ، هو تطعيم مقطع الدنأ لهذا الجين فى دنأ ناقل vector (بلازميد أو فاج) ، ثم إكثار هذا الناقل المطعم ملايين المرات

بواسطة البكتريات الحاملة له ،وبذلك تتوافر لدى الباحث نُسَخاً عديدة من الجين تحت الدراسة .

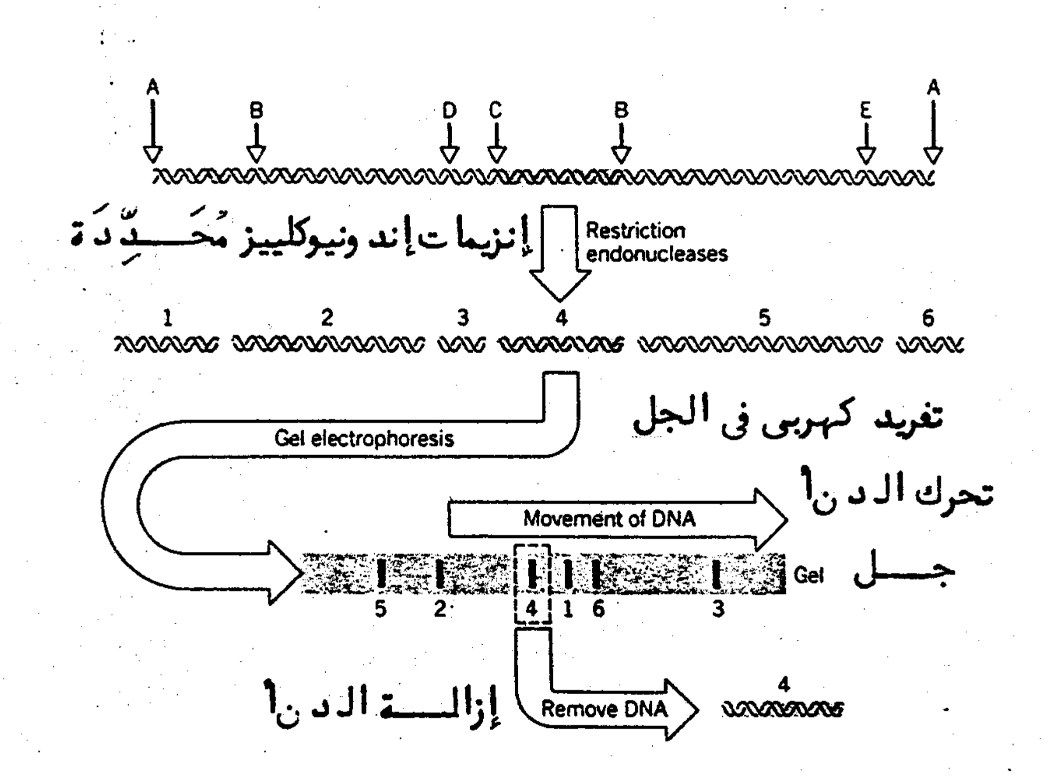
ثانيا : يُحَرَّر مقطع د ن أ الجين (آدمى أو حيوانى أو بكتيرى) من د ن أ الناقل المطعم ويستخدم فى ذلك إنزيمات الاند ونيوكلييز المُحَدَّدة وطرق التفريد الكهربى electrophoresis (كما سوف يأتى بعد) . وفى معظم الأحيان يكون مقطع د ن أ الجين تحت الدراسة مُولَجاً (inserted)فى الناقل فى موقع بالندروم لانزيم إند ونيوكلييز مُحَدَّد (نفس الموقع الذى سبق فتحه قبل إيلاج الجين المرغوب فى الناقل) ،وفى هذه الحالة يستعمل نفس الانزيم المُحَدَّد للمعاملة لتحرير مقطع الجين المرغوب من الناقل المطعم (أنظر الشكل ١٥ـ١) .

ثالثا : لما كان كلٌّ من مقطعى د ن أ الناقل ود ن أ الجين تحت الدراسة عادة بأطوال مختلفة ،لذلك يلجأ المهندس الوراثى إلى استعمال التفريد الكهربى فى الجل gel electrophoresis لفصل مقاطع الد ن أ من بعضها إلى شرائط محددة . كما يمكن إزالة هذه الشرائط بسهولة من الجِلّات. ويحتوى كل شريط على عدد كبير من المقاطع الصغيرة الصنوية identical. واذا تطلب الأمر ،يمكن تقطيع هذه المقاطع إلى عدد أكبر من المقاطع الصغيرة باستخدام إنزيمات تحديد أُخَر ،كما يمكن أيضا فصل هذه المقاطع الأصغر بواسطة التفريد الكهربى فى الجل (الشكل ١٥ـ٢) .

رابعا : بعد الحصول على المقاطع الصغيرة من د ن أ الجين المرغوب،يقوم الباحث الوراثى بتحديد التتابعات النوتيدية لمقطع د ن أ الجين ،كما يتضح من خطوات الطريقة العامة لذلك (الشكل ١٥ـ٣) :



شكل (١٥ ـ ١) : إعادة تشييد موقع تحديد فى الد ن أ المراد تحديد تتابعاته النوتيدية . (أ) جزيئان من الد ن أ يحتويان موقع تعرّف لنفس إنزيم الاندونيوكلييز المحدد (المناطق السوداء) بواسطة نفس إنزيم التحديد .
(ب) لو تمّ لِحام جزيئات الد ن أ مع بعضها من جديد فلسوف يُشَيَّد من جديد موقع التحديد .
(جـ) يمكن بالتالى تقطيع الد ن أ الملحوم إلى شظايا بمعاملة تالية بنفس إنزيم التحديد .



شكل (١٥-٢) : تقطيع الد نأ إلى قطع ذوات أحجام يسهل تداولهـا . تكون شظية الد نأ الآدمى غالبا أطول بكثير من المنطقة المراد تحديد تتابعاتها ، لذلك يجب أن تُقَطَّع إلى مقاطع أصغر . تمثل الأسهم A نهايات شظية الد نأ الآدمى ، وتشير الأسهم B, C, D, E لمواقع الفجّ لأربعة إنزيمات تحديد مختلفة . وتُنْتِج معاملة الد نأ الآدمـى بهذه الانزيمات الأربعة الشظايا من ١ حتى ٦ ، وتُفْصَل هذه الشظايا بواسطة التفريد الكهربى فى الجِلّ . وينتج كل شريط band فى الجل (الشكل ١٥-٦) من أعداد هائلة من جزيئات الد نأ الصنوية . تعزل الشرائط الفردية من الجِلّ بالتقطيع ثم يستخلص منها الـد نأ .

(١) تُشَيَّد على جهاز تحديد التتابعات النوتيدية (وهو يشبه إلى حد كبير جهاز التفريد الكهربى فى شرائح الجل .

نقطة كمرجع نموذجى standard point لقياس المسافة من هذه النقطة لكل واحدة من النوتيدات ذات النوع المعروف ،على سبيل المثال الأدنين (A).
ففى إحدى الطرق المستعملة تعامل أعداد كبيرة جدا من النُّسَخ من شظية د ن أ مفرد الخيط بكمية مناسبة من جزيئات إنزيم بلمرة الـ د ن أ ،حيث يُخَلَّق د ن أ جديد تحت ظروف تسمح بأن تَسْتَهِلّ فيها جميع الجزيئات الجديدة تخليقها عند موقع واحد فى التتابع النوتيدى ،لكن يتوقف تخليقها عند مواقع مختلفة (دائما عند نوتيدة أدنين A (الخطوة رقم ١ فى الشكل ١٥—٣) ٠ و بتخليق عدد كبير من جزيئات الـ د ن أ الجديدة ،يمكن أن يتولد تجمع من شظايا الـ د ن أ الجديد يحتوى على كل الأطوال الممكنة من النقطة القياسية (the standard point) إلى مواقع الأدنين (A's) ٠

(٢) يتم قياس أطوال الشظايا المتولدة بواسطة التفريد الكهربى فى الجل والذى يسمح بتحديد المسافة الدقيقة لكل نوتيدة أدنين (A) فى التتابع النوتيدى من النقطة القياسية (الخطوة ٢ فى الشكل ١٥—٣) ٠

(٣) تُكرّر هذه العملية لكل واحدة من النوتيدات الثلاث الأُخر (الثيمين T ، السيتوسين C والجوانين G) بنفس الأسلوب المبين فى النقطة رقم (٢) ٠

(٤) بعد إتمام العمليات السابقة لكل النوتيدات الأربع ،يصبح من الممكن استنتاج التتابع النوتيدى للجين ٠

وتتطلب العمليات السابقة بعض التفاصيل الأُخَر و التى يجب إضافتها لتوضيح كيفية جعل إنزيم بلمرة الـ د ن أ يستهل start عمله ويتوقف عند الأماكن الصحيحية لكل نوع من النوتيدات:

Many identical single-stranded DNA molecules

جزيئات صنوية من د ن أ مفرد الخيط

1 Add DNA polymerase to obtain limited DNA synthesis

إضافة إنزيم بلمرة د ن أ للحصول على تخليق محدود

a A

b A

c A

d A

Many different DNA fragments with left ends identical and right ends stopping at A's

عن من شظايا د ن أ بنهايات يسرى صنوية و يمنى تقف عند A's

2 Gel electrophoresis of single-stranded DNA

تغريد كهربى فى الجل لد ن أ مفرد الخيط

Direction of DNA movement

اتجاه تحرك الد ن أ

d c b a

شكل (١٥ـ٣) : تخليق وتحليل تَجمُّع من شظايا الدِ ن أ ذوات أطوال مختلفة • (١) يُسْمَح بالتكاثر الجزئى لعدد من جزيئات الد ن أ مفردة الخيط ،حيث يتكون تَجمُّع من جزيئات أصغر (a-d).جميع جزيئات الـ د ن أ الجديدة لها نفس النهاية اليُسْرَى لكنها ذوات نهايات يُمْنَى مختلفة جميعها يتوقف عند نوتيدة A•

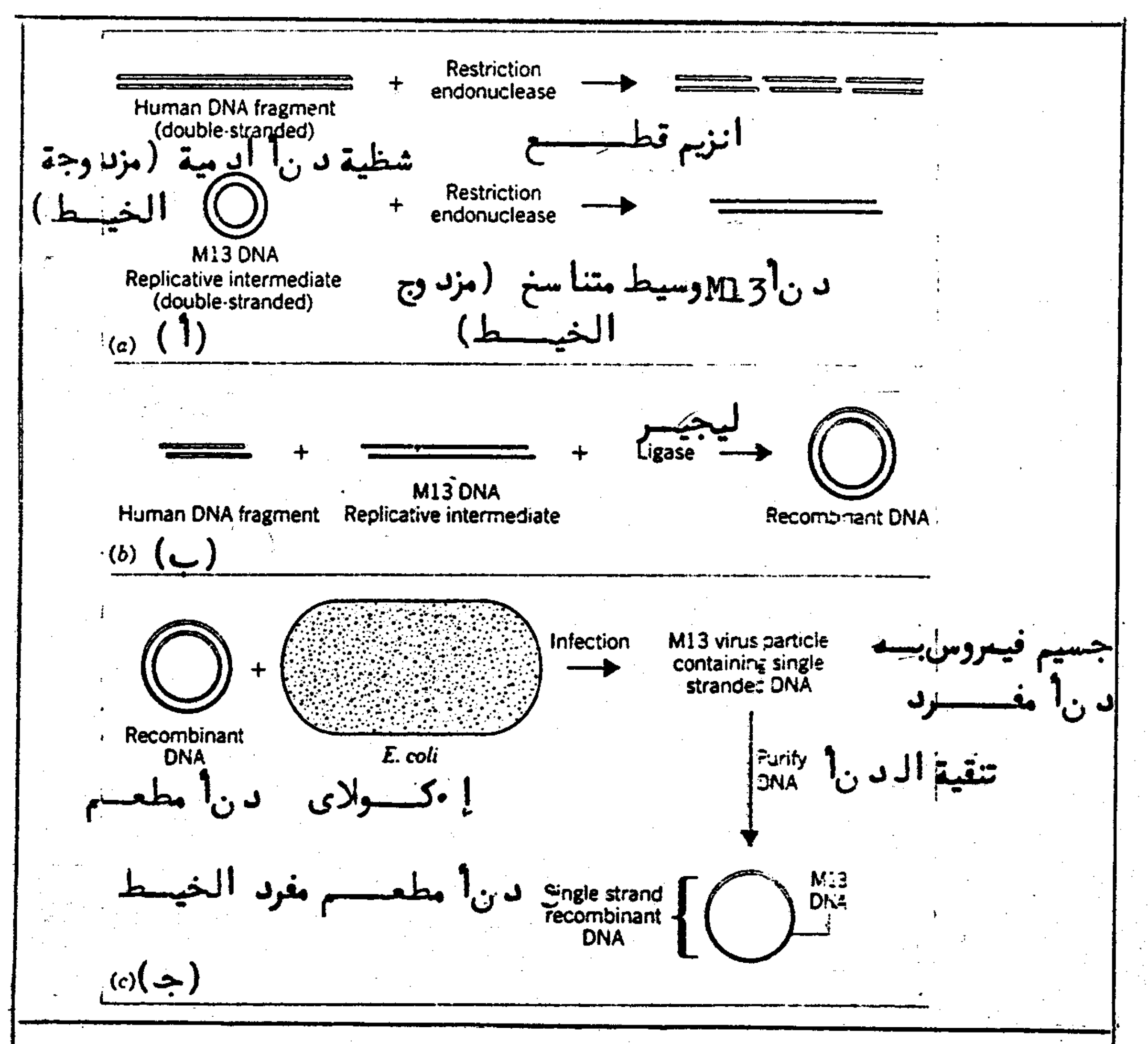
(٢) تُغَيَّر طبيعة الشظايا إلى خيوط مفردة وتحلل بالتغريد الكهربى فى الجِلّ لتحديد الطول من الطرف الشمال لموقع كل A (تكون المسافة التى يتحرك إليها كل جزئ د ن أ متناسبة مع طوله) •

(أ) فى البداية تلصق الشظية المطلوب تحديد تتابعها النوتيدى عند موقع مُحَدَّد فى الد ن أ الخاص بالفاج M13 ،وذلك باستعمال طرق نموذجية للقطع واللصق (الشكل ١٥ــ٤) .

(ب) بعد ذلك يستعمل الد ن أ المطعم للفاج M13 فى عدوى خلايا بكتيرية ، حيث يسمح ذلك بتكوين عدد من الجسيمات الفاجية المُطعَّمة . وتحتوى هذه الجسيمات على خيط مفرد فقط من خيطى الد ن أ (لاحظ أنّ الفاج M13 يحتوى على د ن أ مفرد الخيط) .

(جـ) تُنَقَّى الخيوط المفردة من هذه الفاجات ،ثم تخلط مع مقاطع قصيرة من الد ن أ مفرد الخيط تكون تكاملية لمنطقة فى د ن أ الفاج M13 بالقرب من الموقع الذى يكون قد أُولِج inserted فيه الجين المطلوب تحديد تتابعاته النوتيدية . وتقوم قطعة الد ن أ الصغيرة بتكوين أزواج قواعد مع د ن أ الفاج M13 ،مُخلِّقَةً بذلك مقطعا مزدوج الخيط من الد ن أ يَخْدم كبادئة primer للتخليق (الشكل ١٥ــ٥ أ) .

(د) تشمل الخطوة التالية خلط عدد وفير من هذه الجزيئات مزدوجة الخيط ــ جزئيا ــ مع إنزيم بلمرة الد ن أ ونوتيدات مَوْسومة إشعاعيا ، حيث يقوم هذا الانزيم بتخليق د ن أ مُشِعّ من القالب M13 ،بادئا عند أحد أطراف المقطع القصير مزدوج الخيط (لاحظ أنّ إنزيم بلمرة الد ن أ يحتاج إلى بادئة primer كىّ يستهل تخليق الخيط الجديد من الد ن أ ،ومن ثم فهو يستَهِلّ التخليق على البادئة مزدوجة الخيط فى الفاج M13) . وعلى التوّ يندفع الانزيم إلى منطقة الد ن أ الخاصة بالجين تحت الدراسة ،مستعملا إيّاهُ كقالب لتخليق د ن أ جديد . ويمكن وقف عمل إنزيم البلمرة وذلك بادخال نوتيدة نظيرة (analogue) فى مخلوط التفاعل ،حيث لايمكن استعمالها لاستمرار نمو سلسلة الد ن أ ،فاذا سلكت هذه النوتيدة النظيرة كوحدة



شكل (١٥ـ٤) : الاستزراع (الكلونة) فى الفاج M13 .

(أ) يستعمل إنزيم إندونيوكليز مُحَدِّد لقطع شظية د نأ آدمى ٠ وسيـــط متناسخ من د نأ مزدوج الخيط مُنَقًى للفاج M13 (تُكَوِّن الفيروســات مفردة خيط الد نأ جزيئات د نأ مزدوجة كجزء من دورة حياتها) ٠

(ب) تُخلَط جزيئات الد نأ مع بعضها وتلحم بإنزيم الليجيز لتكـــوّن د نأ مطعم ٠ (جـ) يستعمل الد نأ المطعم لعدوى خلايا إ٠كـــولاى لتنتج فيروسات M13 ٠ يحتوى الجسيم الفيروسى على واحد فقط مـــن خيطى الد نأ ٠ بعد ذلك يمكن تنقية وفصل كميات كبيرة من خيط الـد نأ هذا وهو متماثل لجميع جسيمات الفيروس٠

أدنين (A) فلسوف يتوقف نمو السلسلة الجديدة الموسومة إشعاعيا بعد ما تكون عادة قد أضافت وحدة أدنين طبيعى A (الشـــكل ١٥ــ٥ب) •

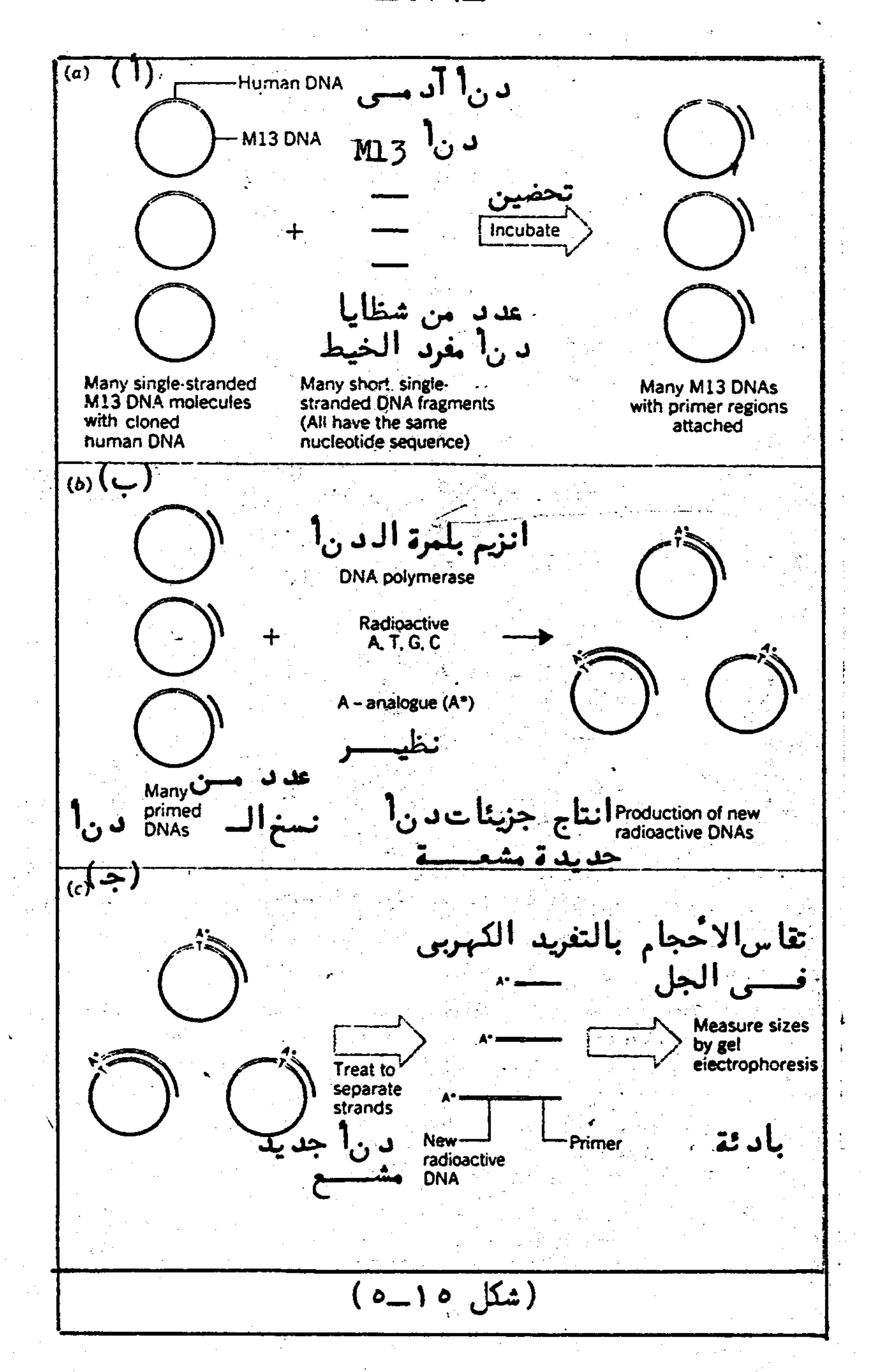
(هـ) تضاف وحدات أدنين (A) طبيعية فى مخلوط التفاعل لتسمح بتخليـــق بعض الد ن أ قبل ماتوقف الوحدة النظيرة A عملية التفاعل • ولماكان العديـــد من النوتيدات A موجودا فى التتابع ،فإنّ التوقف سوف لايكون دائما فى نفـــس المكان • ومن ثمّ ،وبواسطة ضبط كميات النظير فى مخلوط التفاعل ،يكون مـــن الممكن تخليق مُحَصِّلة من مقاطع الد ن أ المشعة تبتدئ عند نقطة محـــددة (عند نهاية البادئة Primer) ،وتتوقف عند المواقع المختلفة حيثما توجد النوتيدات A's .

(و) تُكرّر العملية بنفس الأسلوب فى ثلاثة أنابيب اختبار أُخَر مختلفة باستعمـــال نظائر (analogues) لكل من C, G و T ،ومن ثم يمكـــن تخليق أربع مجموعات منفصلة من جزيئات الد ن أ ،حيث يبتدئ كل جزئ فـــى نفس المكان ،لكن الانواع المختلفة تنتهى على مسافات مختلفة من نقطة البداية.

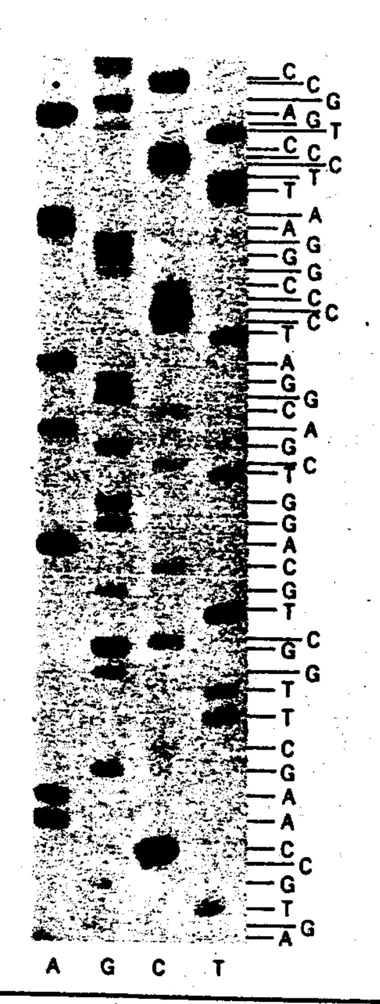
(ز) بعد ذلك يبدأ قياس أطوال الجزيئات بواسطة التفريد الكهربى فى الجِـلّ تحت ظروف غاية فى الدقة ،بحيث تسمح بعزل جزيئات د ن أ تختلف فى نوتيـــدة واحدة فقــــط •

(ح) تُفرَّد الجزيئات الاربعة كهربيا (electrophorized) بجوار بعضهـــا ، على نفس الجِلّ ،وتؤخذ لها صورة ذاتية الاشعاع autoradiograph، وتختبر الجزيئات المشعة ،وليس من الضرورى أن تؤخذ فى الاعتبار شظايـــا الد ن أ غير المشعة الكثيرة والتى قد تُعَقِّد التحليل ،وتوضح الصورة الواقعيـــة فى الشـــكل (١٥ــ٦) سلسلة من الشرائط الخاصة بـالنوتيدات فى التتابـــع والموضح بالحروف على يمين الصورة • والشريط الادنى فى الشـــكل (١٥ــ٦) يمثل جزيئات د ن أ تمتد إلى النوتيدة A لانها تظهر فى العينة المحتويـــة

شكل (١٥ـ٥) : تخليق تجمّع من نُسَخ د نأ مستزرعة ذوات أطوال متغيـــرة.
(أ) تخلط نُسَخ عديدة من د نأ مفرد الخيط مطعم للفـــــاج M13
(أنظر الشكل ١٥ـ٤) مع شظايا د نأ مفرد الخيط قصيرة تكامليـــــة
لمنطقة من د نأ الفاج M13 بالقرب من منطقة الاتصال مابين د نأ
الفيروس M13 وال د نأ المستزرع ،حيث تكوّن الشظية منطقة مزد وجة الخيط
مع د نأ الفاج M13. (ب) تسلك منطقة ال د نأ مزد وج الخيط كبادئـــة
primer لانزيم بلمرة ال د نأ . يُخَلّق د نأ جديد من نوتيــــدات
موْسُومة إشعاعيا عند أُحد طرفى A's , T's , G's, C's
البادئة . يضاف نظير لـA (Å) لإعاقة التخليق عند المواقع المختلفة عنــد
مكان النوتيدة T التكاملية فى التتابع النوتيدى لل د نأ المستزرع .
(جـ) تعامل جميع جزيئات ال د نأ حتى تصبح جميعها مفردة الخيـــط ،
بعد ذلك تقاس أطوالها بواسطة التفريد الكهربى فى الجِــلّ .


(a) (أ)
Human DNA
دنا آدمى
M13 DNA
دنا M13
تحضين
Incubate
عدد من شظايا
دنا مفرد الخيط
Many single-stranded M13 DNA molecules with cloned human DNA
Many short, single-stranded DNA fragments (All have the same nucleotide sequence)
Many M13 DNAs with primer regions attached
(b) (ب)
انزيم بلمرة الدنا
DNA polymerase
Radioactive A, T, G, C
A – analogue (A*)
نظير
عدد من
نسخ الـ دنا
Many primed DNAs
انتاج جزيئات دنا
حديدة مشعة
Production of new radioactive DNAs
(c) (جـ)
تقاس الأحجام بالتفريد الكهربى
فى الجل
Measure sizes by gel electrophoresis
Treat to separate strands
دنا جديد
مشع
New radioactive DNA
Primer
بادئة

(شكل ١٥ـ٥)



شكـــل (١٥ـ٦)

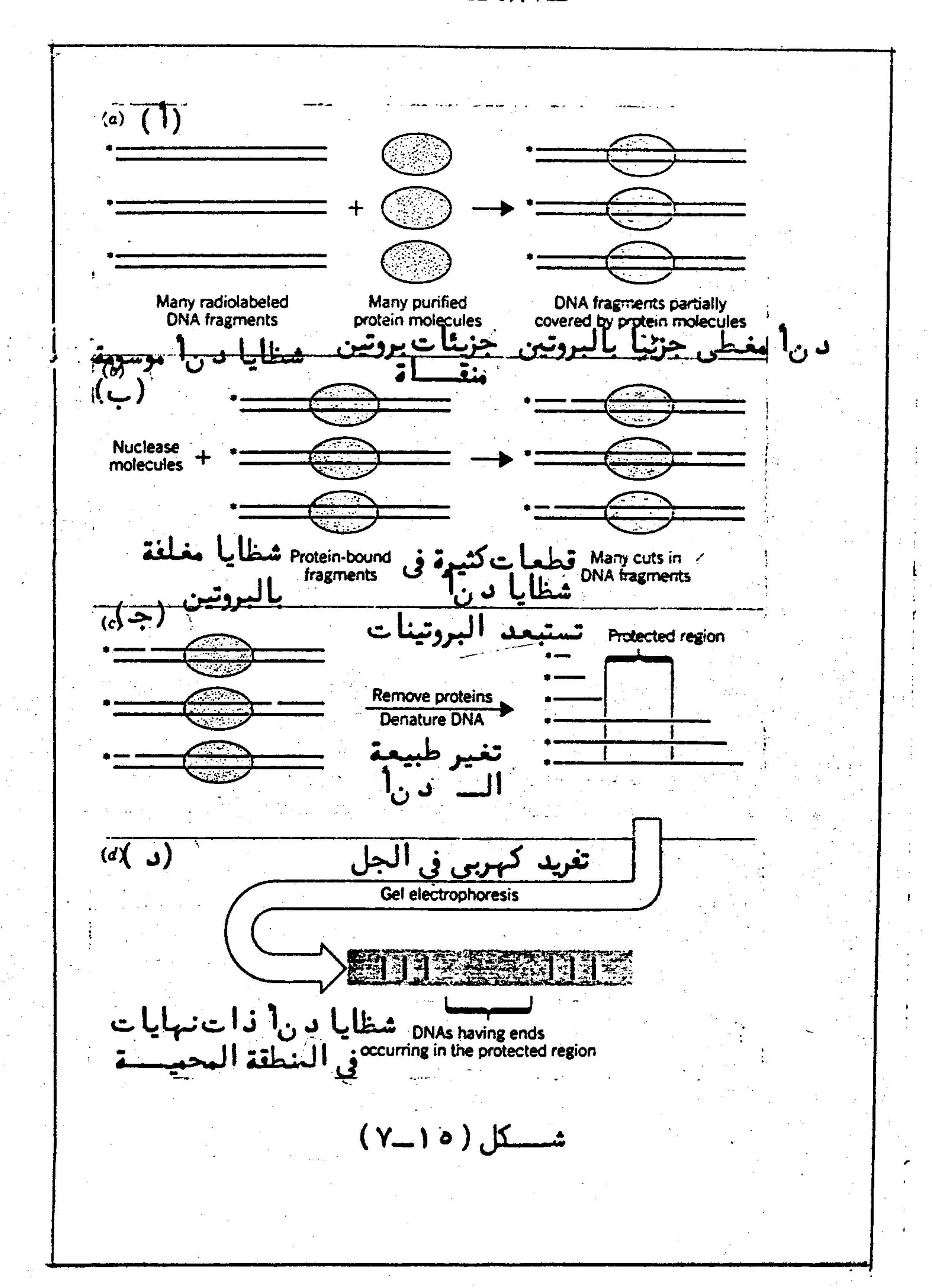
صورة لجِل تحديد تتابعات الد ن أ . تُفرَد كهربيا أربـــع عينات من الد ن أ الموسوم إشعاعيا فى مسارات lanes متجـــاورة . العينات الأربع الموسومة لـ A, T, G, C الموجودة أسفل الصورة خُلِقت فى وجود نظائر للقواعد على التوالى ، كما هو موضح فى الشكل (١٥ـ٥) . مبين التتابع النوتيدى للد ن أ ناحية يمين الصـــورة .

على النوتيدة النظيرة A . والشريط الأعلى التالى يقع فى خط (lane)
النوتيدة النظيرة G (G-analogue) ،ومن ثمّ فالنوتيدة التالية هى G . و
بناء على ذلك يمكن قراءة التتابعات النوتيدية مباشرة من صور الجِلّات كما هو
موضح فى الشكل (١٥–٦) .

ويمكن توفيق التتابعات النوتيدية مع بعضها لاستنتاج تتابعات طويلة
جدا من الدنأ وذلك من تحليل التتابعات لعدد من شظايا التحديد
restriction fragment المتجاورة . ولقد تمّ – منذ وقت قريب – تحديد
التتابع النوتيدى الكلى لدنأ البكتريوفاج لامبدا بمثل هذه الطريقة ،وظهر
أنه يتكون من ٤٨٤٩٨ نوتيدة . وقد وُجِدَ أنّ جينات معينة تقع ضمن هذا
التتابع ،وذلك بمقارنة التتابع النوتيدى لما هو متوقع من تتابع الأحماض الأمينية
للبروتين المُخَلَّق من الجين . فعلى سبيل المثال ،إذا كان الحمض الأمينى
الأول على الطرف الشمال للبروتين هو المثيونين والحمض الثانى ناحية الشمال
هو التريبتوفان والثالث هو الفينيل ألانين ،فإننا – طبقا لرموز الشفرة
الوراثية – نتوقع أنّ التتابع النوتيدى لذلك الجين هو (من الشمال لليمين)
-A-T-G-T-G-G-T-T(T or G) ،وذلك بمعرفتنا للكودون الثلاثى لكل
حمض أمينى . وحيث أنّ الشِّفرة الوراثية مَرِنَة (degenerate) ،فيمكن
أن تكون النوتيدة التاسعة إمّا T أو C ،وذلك لأنّ الفينيل ألانين
يُشَفَّر له بثلاثيتين : T-T-T أو T-T-C (أنظر قاموس الشفرة الوراثية – جدول
١١–٢ – الباب ١١) . ويسمح هذا النوع من المقارنة بالتحديد الدقيق
لموقع الجين (أىَّ جين) . وفى الوقت الحاضر يقوم علماء البيولوجيا بفحص
التتابعات النوتيدية داخل inside وخارج outside الجينات لمحاولة تفهم
كيفية تشغيل ووقف نشاط هذه الجينات .

شكل (٥ ١ ـ ٧) : وقاية الـ د نأ بواسطة البروتيـــن ٠

(أ) تخلط شظايا الـ د نأ الموسومة اشعاعيا (*النجمة) على أحـــد الخيوط مع جزيئات منقاة من البروتين ٠ يرتبط البروتين بشظايا الـ د نأ مُغَطِّية منطقة منه ٠ (ب) تضاف جزيئات من إنزيمات النيوكلييز إلـــى معقد البروتين والـ د نأ ،ثم تقطع خيوط الـ د نأ ،ويمكن أن يحـــدث القطع فى أىّ منطقة فيماعدا المنطقة المرتبط فيها البروتين مع الـــد نأ ٠ (ج) تزال البروتينات بالمعاملة بمحلول منظف أو انزيمات البروتييـــز ، وتُحَوَّل الجزيئات المزدوجة إلى خيوط مفردة ٠ وتسبب المعاملة بإنزيـــم البروتييز جَعْل مقاطع الـ د نأ ذات أطوال مختلفة ،و تؤخذ فى الاعتبار الجزيئات الموسومة إشعاعيا لانها هى التى تُقَاس كما فى الخطـــوة د ٠ لاحظ أنه لاتوجد كل الأحجام من الـ د نأ ،وذلك لأنّ البروتيـــن يوقف القطع فى بعض المناطق أثناء المعاملة بالبروتييز فى الخطـــوة ب ليعطى مناطق مَحْمِية من الـ د نأ ٠ (د) تُحلّل أطوال الـ د نأ الموسومة إشعاعيا بواسطة التحليل الكهربى فى الجِـلّ ،ولا تظهر شرائط لـهـــا نهايات فى المناطق المحميـــة ٠


(a) (أ)
Many radiolabeled DNA fragments
شظايا د ن أ موسومة
Many purified protein molecules
جزيئات بروتين منقاة
DNA fragments partially covered by protein molecules
د ن أ مغطى جزئيا بالبروتين
(b) (ب)
Nuclease molecules
Protein-bound fragments
شظايا مغلفة بالبروتين
Many cuts in DNA fragments
قطعات كثيرة فى شظايا د ن أ
(c) (جـ)
Remove proteins
تستبعد البروتينات
Denature DNA
تغير طبيعة الـ د ن أ
Protected region
(d) (د)
Gel electrophoresis
تغريد كهربى في الجل
DNAs having ends occurring in the protected region
شظايا د ن أ ذات نهايات في المنطقة المحمية

شـــكل (١٥ـ٧)

(٢) تحليل وظيفة وعمل الجين : Analysis of Gene Function

من المعروف أنّ النواتج البروتينية لكثيرمن الجينات الهامة توجد بكميات ضئيلة للغاية داخل الخلايا الحية • وغالبا مايكون من الصعب جدا الحصول على كمية كافية من بروتين معين لدراسة خصائصه وتداخلاته مع الجزيئات الأخَر في الخلية • ولكن في بعض الحالات أمكن لتكنيك الاستزراع الجيني حَلّ هذه المشكلة • فقد أمكن فصل وتنقية بروتينات جينات معينة باستخدام تقنيات الاستزراع ،واستعملت هذه الجينات لتوجيه خلايا لانتاج كميات وفيرة من هذه البروتينات • ولقد وُجد أنّ بعضاً من هذه النواتج البروتينية لها أهمية خاصة لانها تعمل على الدنأ • وتمثل بروتينات الكبت repressor proteins أحد هذه النواتج • وكما أشرنا في الباب الثاني عشر نجد أنّ بروتينات الكبت تمنع إنزيم بلمرة الرنأ من نسخ الرنأ من جينات معينة ،ومن ثَمّ فهذه البروتينات تُنَظِّم تعبير الجين • ويشمل تفهم ذلك الحدث المعرفة التامة لمكان ربط البروتين الكابت مع الدنأ • ولقد مكنت تقنيات الاستزراع الجيني من الحصول على كميات وفيرة من كل من البروتين الكابت والمواقع المؤهلة للربط مع الدنأ • وعند خلط الاثنين معا ،تتكون معقدات من البروتين والدنأ • وفي هذه المعقدات complexes نجد أنه تتم حماية الدنأ من القطع الذى ينتج من إضافة إنزيمات النيوكلييز إلى مثل هذه التحضيرات (الشكل ١٥ـ٧) • ويترتب على ذلك أن تحليل التتابعات النوتيدية التى تتخطى الاصابة بالمعاملة بانزيمات النيوكلييز يُوفّر معلومات واضحة عن أماكن ربط البروتين الكابت (repressor binding/sites)، وهذه المعلومات تلزم لمعرفة التركيب الدقيق للجين وتنظيم عمله) (أنظر الشكل ١٢ ـ٢) •

(٣) دراسة التحويلات فى عمل الجين أثناء التمايز والتكشف:

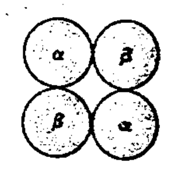
Developmental Switching of the Genes

تحليل جينات الهيموجلوبين : Analysis of Hemoglobin Genes and pseudogenes

لقد أمكن دراسة بروتينات هيموجلوبين الدم دراسة مكثفة منذ فترة طويلة . ولسوف نعرض لبعض الحقائق الخاصة بهذا البروتين :

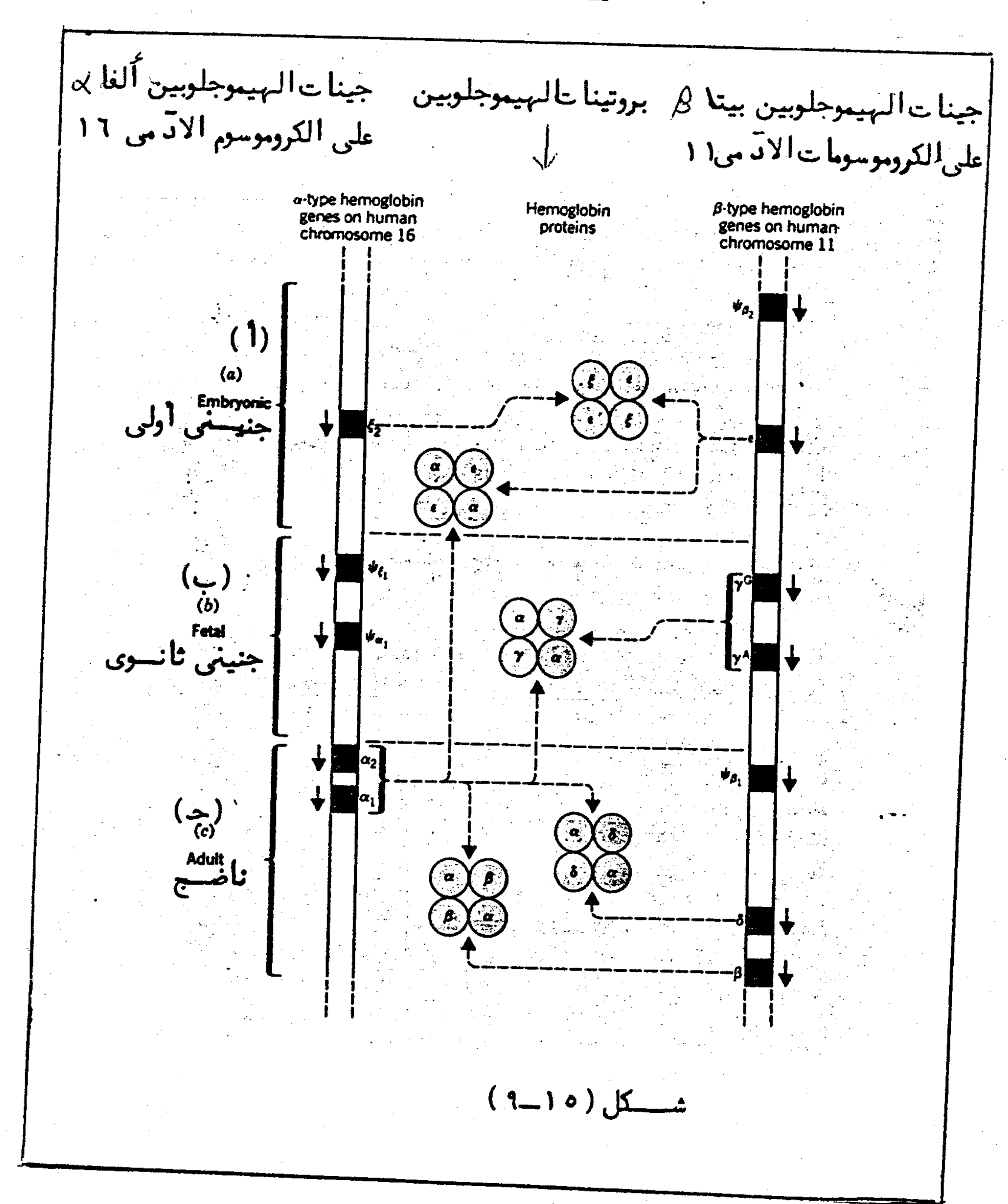
(١) الحقيقة الاولى هى : يتكون الهيموجلوبين من أربع تحتوحدات subunits وهى أربع سلاسل بروتين منفصلة تسمى الجلوبينات globins تترابط تلقائيا لتكون البروتين الفعال . وتوجد سلاسل البروتين الاربع فى طرازين ،اثنتان من الطراز ألفا alfa (α)واثنتان من الطراز بيتا beta (β) ويختلف طرازا البروتين إختلافات طفيفة فى كلٍّ من الطول وتتابع الاحماض الأمينية ،وهما يتزاوجان فى صورة جزئ هيموجلوبين . وبناء على ذلك يسمى الهيموجلوبين الناضج adult عادة بـ هيموجلوبين ألفا وبيتا (الشكل ١٥ـ٨).

(٢) الحقيقية الثانية هى : يوجد عدة أنواع من الهيموجلوبين ،وعند مختلف أطوار حياة الانسان تقوم جيناته بإعطاء التعليمات لخلايا الدم لتنتج بروتينات جلوبين مختلفة . ويُميّز كل نوع من الهيموجلوبين عن الآخر بنوعية السلاسل المكونة من تحت وحدات subunit chains . فعلى سبيل المثال يحتوى دم الأجنة الآدمية الصغيرة embryos نوعين من الهيموجلوبين الجنينى هما $\epsilon_2 \zeta_2$ و $\alpha_2 \epsilon_2$. وبعد ثمانية أسابيع من الحمل تُسْتَبْدَل الطرز الجنينية تدريجيا بطرز هيموجلوبين من نوع جنينى آخر (fetal form) يسمى $\alpha_2 \gamma_2$. ويستبدل النوع الأخير ،والذى يستمر حتى عمر ٦ أشهر عقب الولادة ،بالطرز الناضجة للهيموجلوبين وهى $\alpha_2 \beta_2$ و $\alpha_2 \delta_2$.



شكل (١٥ ـ ٨) : مخطط يبين تركيب الهيموجلوبين • يتكون الهيموجلوبين من وحدتين فرعيتين لكلٍ من وحدتين أصليتين من وحدات البروتين • تسمى هذه الوحدات الفرعية بـ ألفا α وبيتا β في الهيموجلوبين الناضج •

شكل (١٥ ـ ٩) : جينات الجلوبين الآدمية ونواتجها البروتينية • يتكون البروتين (مرسوم كأربع دوائر) من طرازين من البروتين ،ويختلف التركيب باختلاف طور النمو من خلال التحفيز التفضيلي (differential activation) لجينات الجلوبين •
(أ) الطرز الجنينية الأولية (embryonic forms) السائدة حتى ٨ أسابيع من الحمل و (ب) الطرز الجنينية الثانوية fetal form السائدة حتى ٦ شهور من الولادة و (جـ) الطرز الناضجة adult من ٦ أشهر حتى نهاية العمر • تشير الأسهم السوداء البارزة الى اتجاه النسخ transcription تمثل المناطق السوداء جينات الجلوبين الكاذبة pseudogenes جينات الطراز بيتا β مبعثرة على امتداد ٥٢٠٠٠ زوج من النوتيدات ،بينما تقع جينات الطراز ألفا α داخل منطقة طولها ٣٦٠٠٠ زوج نوتيدى •


جينات الهيموجلوبين ألفا α
على الكروموسوم الآدمى ١٦
بروتينات الهيموجلوبين
جينات الهيموجلوبين بيتا β
على الكروموسومات الآدمى ١١
α-type hemoglobin genes on human chromosome 16
Hemoglobin proteins
β-type hemoglobin genes on human chromosome 11
(أ)
(a)
Embryonic
جنينى أولى
(ب)
(b)
Fetal
جنينى ثانوى
(جـ)
(c)
Adult
ناضج

شكل (١٥—٩)

(٣) الحقيقة الثالثة هى : لقد وُجِد أنّ هناك جينات منفصلة تُشَفِّر لتحت وحدات الهيموجلوبين $\beta, \delta, \gamma, \varepsilon, \alpha$, ، ζ ويترتب على ذلك تساؤل وهو كيف لهذه الجينات أن تُشَغَّل وتُوقَف switched on & off أثناء النمو لانتاج الطرز الصحيحة للهيموجلوبين لكل طور من أطوار النمو .

إنّ تقنيات الـ د ن أ المطعم وكذلك دراسات تحديد التتابعات النوتيدية للـ د ن أ لم تُقدِّم جوابا حاسما بعد عن كيفية حدوث التحويلات فى نشاط الجين ، إلاّ أنها يَسَّرت لعلماء الوراثة وضع أربع خصائص عن كيفية تنظيم الجينات (أنظر الشكل ١٥–٩ كرسم تخطيطى لتنظيم جينات الجلوبين) :

أولا : تقع جينات الجلوبين فى فئتين ، الفئة ألفا α تشمل الجينين ζ و α ، والفئة بيتا β تشمل الجينات γ , β (A و G) ، ε و δ .

ثانيا : تقع جينات إحدى الفئات فى منطقة واحدة من الـ د ن أ ، لكن تقع جينات الفئة الاخرى بعيدا على كروموسوم آخر .

ثالثا : تكون البروتينات فى إحدى الفئات وكذلك الجينات التى تشفر لها، لها نفس التراكيب . فمثلا تتكوَّن النواتج البروتينية للفئة ألفا α الجنينية embryonic واليافعة adult من ١٤١ حمضا أمينيا فى الطول لكنها تختلف اختلافا طفيفا فى تتابع أحماضها الامينية .

رابعا : توجَد جينات الهيموجلوبين الآدمية فى الفئة الخريطية بنفس الترتيب الذى تُعَبِّر به عن نفسها أثناء النمو . فعلى سبيل المثال ، تنتظم جينات الفئة بيتا β خريطيا بالترتيب (الشكل ١٥–٩) :

ε (embryonic), γ^G (fetal), γ^A (fetal), δ (adult) & β (adult).

كما وجد أنّ الترتيب ذاته يُحتَفَظ به عند تخليق الـ م•رنأ من الجينات. فلكل جين نجد أنّ تخليق الـ رنأ يبتدىء عند النهاية القريبة جدا من الجين الجنينى embryonic - (الأسهم فى الشكل ١٥-٩) ،كما أنّ جميع جزيئات الـ م•رنأ تُخَلَّق من نفس خيط الـ د نأ (لاحظ أنّ خيطى الـ د نأ متكاملان ،لكنهما ليسا صنوان ،ومن ثم لا يُشَفِّران لنفس البروتينات) •

لقد كشفت دراسات التتابع لمناطق جينات الجلوبين -أيضا- عدة مقاطع قصيرة أُخَر من الـ د نأ تشبه تماما جينات الجلوبين ، فقد أظهر التحليل الدقيق للتنظيم النوتيدى أنّ هذه "الجينات" (المناطق السوداء (//) فى الشكل ١٥-٩)غير قادرة على تخليق بروتينات جلوبين فَعَّالة ، حيث أنها مليئة بالطفرات والتنظيمات الشاذة مثل :

كودونات التوقف غير الناضجة	premature stop codons
طفرات انحراف الاطار	frameshift mutations
مواقع ربط إنزيم بلمرة الـ رنأ (المُحفِّزات)	abnormal RNA polymerase binding sites (promotors).
كودونات استهلاك التناسخ الخاطئة	faulty initiation codons
الانتقاصات الداخلية الكبيرة	large internal deletions

وجميع هذه التنظيمات الوراثية الشاذة لا تسمح بتخليق بروتينات جلوبين فَعَّالة من مثل هذه المقاطع المشابهة للجينات والتى تسمى "الجينات الكاذبة pseudogenes " • ولقد طَرَحَ اكتشاف الجينات الكاذبة عدة تساؤلات على علماء البيولوجيا الجزيئية هى :

١- هل تنشأ الجينات الكاذبة من تكرارات duplications لجينات فَعَّالة سابقة الوجود ؟

٢ ـ هل كل جينات الجلوبين الحديثة قد نشأت من سلف جين بدائـــى ؟

٣ ـ كيف يحدث تكرار لمقطـــع جين مـــا ؟

ويعتبر النظام البيولوجى للهيموجلوبين من الانظمة المعقدة • وكمـــا هو الحال فى كل الانظمة البيولوجية المعقدة ،توجد عدة خطوات قد تتجـــه اتجاها خاطئا يترتب عليه الاصابة بأمراض مستعصية • وتنشأ إحدى هذه الفئات المرضية من الاستبدالات النوتيديـــة (nucleotide substitutions) فى الجينات والتى تتسبب فى تبدّلات الأحماض الأمينية لبروتينات الجلوبيـــــن (أنظر الباب الخامس) • ومن بين أكثر من ٣٠٠ طفرة أمكن تحديدها ،تعتبـــر الطفرة فى جين البيتا-جلوبين β-globin gene ،والمسببة لمـــرض أنيميا الخلايا المنجلية sickle cell anemia ،وهى أكثرها انتشارا • وتوجد مجموعة أخرى من شواذ الهيموجلوبين تسمى "فاقة البحـــر الابيض المتوسط ـ تالاسيميا Thalassemias" • وهذه تنشأ من انتقـــاص لاحد الطرز المحددة لبروتين الجلوبين • وتوجد أيضا بعض الاضطـــرابات الدموية الوراثية الاُخَر والتى تنشأ من حالات فشل التحول من أحـــد طـــرز الهيموجلوبين الى آخر أثنـــاء نمـــوّ الكائـــن •

تقنيات الهندسة الوراثية والعلاج الجينى لأمراض الدم :

بمجرد ما أمكن تفهم الاساس الجزيئى لبعض الامراض الوراثية ،بـــدأ اهتمام العلماء فى البحث عن وسائل علاجها • فعلى سبيل المثال ،لوأخذنـــا فى الاعتبار حالة مرض أنيميا الخلايا المنجلية ،فإنّ هذا المرض يمكن علاجـــه من خلال استبدال بروتين البيتا-جلوبين β-globin • فمن المـــعروف أنّ دم مريض الخلايا المنجلية يحتوى على ثلاثة طرز أُخَر من البيتا ـ جلوبيـــن

هى ε γ δ (إيتا ،جاما، وسيجما) . فاذا عرفنا كيف يعمل التحول من جاما إلى بيتا (γ-β switching) ،فلربما نكون قادرين على وقف نشاط جين بيتا ـ جلوبين الخلايا المنجلية switch off ،وتشغيل switch on جين جاما ـ جلوبين الجنينى fetal γ-globin gene ومن ثم نتمكن من علاج المرض بطريقة غير مباشرة . وفى هذه الحالة نجد أنّ دم المريض قد يحتوى على هيموجلوبين جنينى fetal عادى وليس طراز الهيموجلوبين اليافع المعيب . ويلاحظ أنّ الطراز الجنينى fetal قد لا يعمل بكفاءة مثل الطراز اليافع adult ،ولكن على الرغم من ذلك فقد وجد أنّ الافراد البالغين والذين يحتوى دمهم طبيعيا على هيموجلوبين جنينى fetal وليس هيموجلوبين يافع adult يكونون أصحاء . وتجرى فى الوقت الحاضر محاولات لوضع مثل هذا السيناريو موضع التطبيق العملى ،مما يوضح العلاقة الوطيدة مابين البحث البيولوجى الاساسى والطب.

(٤) تنظيم الجين فى بدائيات النوى وفى مميزات النوى على ضوء المعلومات المتوفرة من تقنيات الهندسة الوراثية :

وفرت تقنيات الاسترزاع الجينى وتحديد التتابعات النوتيدية لمقاطع دنا الجينات وكذلك تحديد تتابعات الأحماض الأمينية لنواتج بروتينات هذه الجينات معلومات هامة عن تنظيم الجينات فى كل من الكائنات بدائيات النوى والكائنات مميزات النوى ، وظهر أنّ هناك اختلافات جوهرية فى هذه التنظيمات سوف نعرضها فيما يلى :

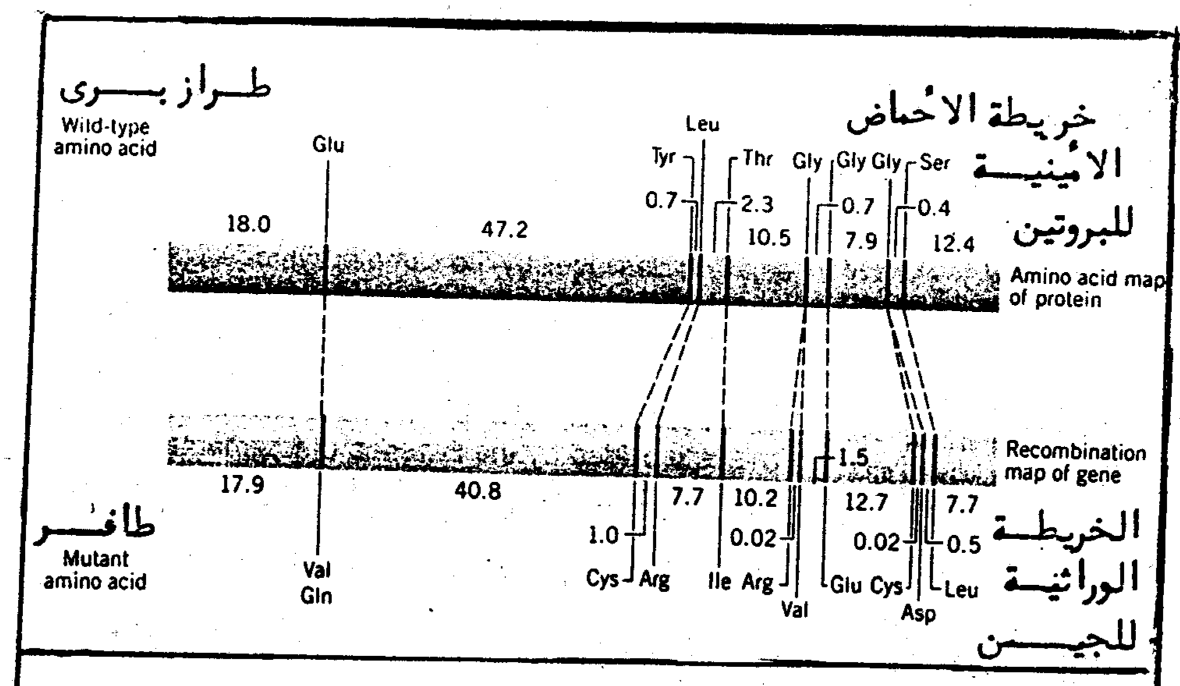
أولا : جينات بدائيات النوى : Prokaryotic Genes

بمقارنة التتابع النوتيدى لجين ما مع تتابع الأحماض الأمينية للبروتين المشفّر

له بواسطة هذا الجين ،يمكن مباشرة استنتاج ما اذا كان هناك توازٍ طولي colinearity مابين الجين وبروتينه ،بمعنى أنّ التتابع النوتيدي للشفرات في الجين يتوافق تماما مع تتابع الأحماض الأمينية في البروتين •

لقد وجد في البكتريات وفاجاتها توافقا تاما بين الجزيئين البيولوجيين، فكل جين يحتوى على تتابع مستمر من الد ن أ يتوافق طوله مباشرة مع طول البروتين الذى يمثله • فتتابع مكون من (٣ن) من أزواج القواعد يلزم ليسيطر شفريا على بروتين مكوّن من (ن) من الأحماض الأمينية ،وذلك على ضوء الطبيعة الثلاثية للشفرة الوراثية •

إنّ التوافق مابين جين ما بدائي النوى وناتجة البروتيني يعني أن خريطة التحديد restriction map لد ن أ هذا الجين سوف تتناغم تماما مع خريطة الأحماض الأمينية amino acid map لهذا الناتج البروتيني وهنا يبرز سؤال يطرح نفسه وهو :كيف تتوافق هذه الخرائط مع خريطة التوليفات الوراثية "The recombination map" ؟ قد تمت الدراسة الأولى للتوازى الطولي colinearity مابين الجين والبروتين لجين تخليق إنزيم التريبتوفان tryptophan synthetase في إ •كولاى • ولقد قيست المسافة الوراثية genetic distance بواسطة النسبة المئوية للاتحادات الجديدة بين الطفرات ،كما أنّ المسافة البروتينية protein distance قد قيست بعدد الأحماض الأمينية التى تفصل مواقع الاحلال sites of replace-ment • ويظهر من الشكل (١٥—١٠) مقارنة مابين الخريطتين ،حيث أنّ ترتيب سبعة مواقع طفرية mutational sites مماثل للترتيب المقابل لمواقع الاحلال لأحماض أمينية ،كما أنّ المسافات الخريطية تكون نسبيا مماثلة للمسافات الحقيقية في البروتين (في هذا المثال يوجد اختلاف نسبي بسيط مابين الخريطة الوراثية والخريطة الفيزيائية) •



شكل (١٥ـ١٠)

شكل (١٥ـ١٠) : خريطة التوليفات الوراثية لجين انزيم تخليق ال التريبتوفان تتوافق مع تتابع الأحماض الأمينية للبروتين • تشير الخطوط السوداء للمواقع الطفرية فى الجين أو فى تتابع الأحماض الأمينية للبروتين • تشير المسافة بين الخطوط السوداء الى البعد النسبى على الخريطة كما يتضح من الأرقام • توسع الخريطة الوراثية المسافات بين بعض الطفرات ،لكنها فى الغالب تتناغم جيدا ملامح التركيب الفيزيائى للجين والبروتين •

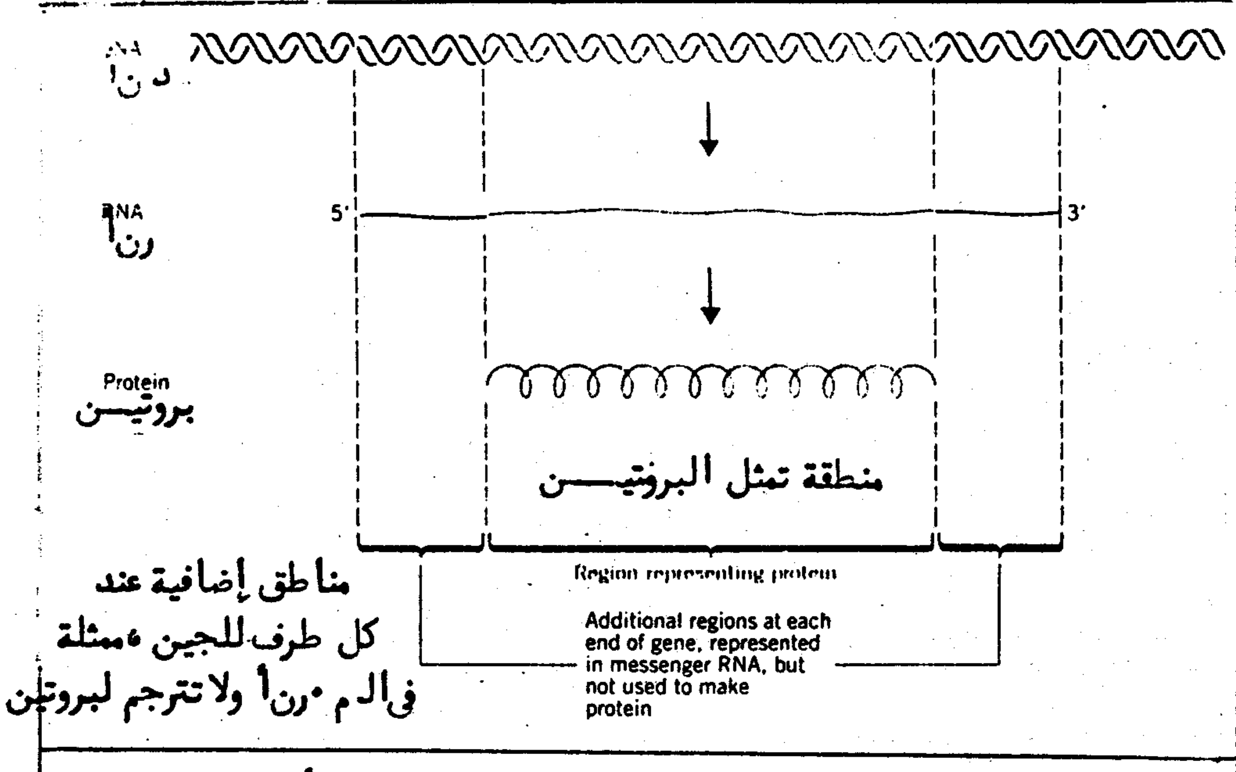
(عن كتاب Genes III (١٩٨٧) : Benjamin Lewin)

وعند مقارنة الجين والبروتين فإننا هنا نحدد أنفسنا للتعامل مع تتابع الـ د ن أ الذى يمتدُّ بين النقاط التى تتوافق مع نهايات البروتين • وبالرغم من ذلك فإنّ الجين لايُتَرْجَم مباشرة إلى بروتين ،لكنه يُعَبَّر عنه من خلال إنتاج الـ رن أ حامل الرسالة messenger RNA (mRNA).

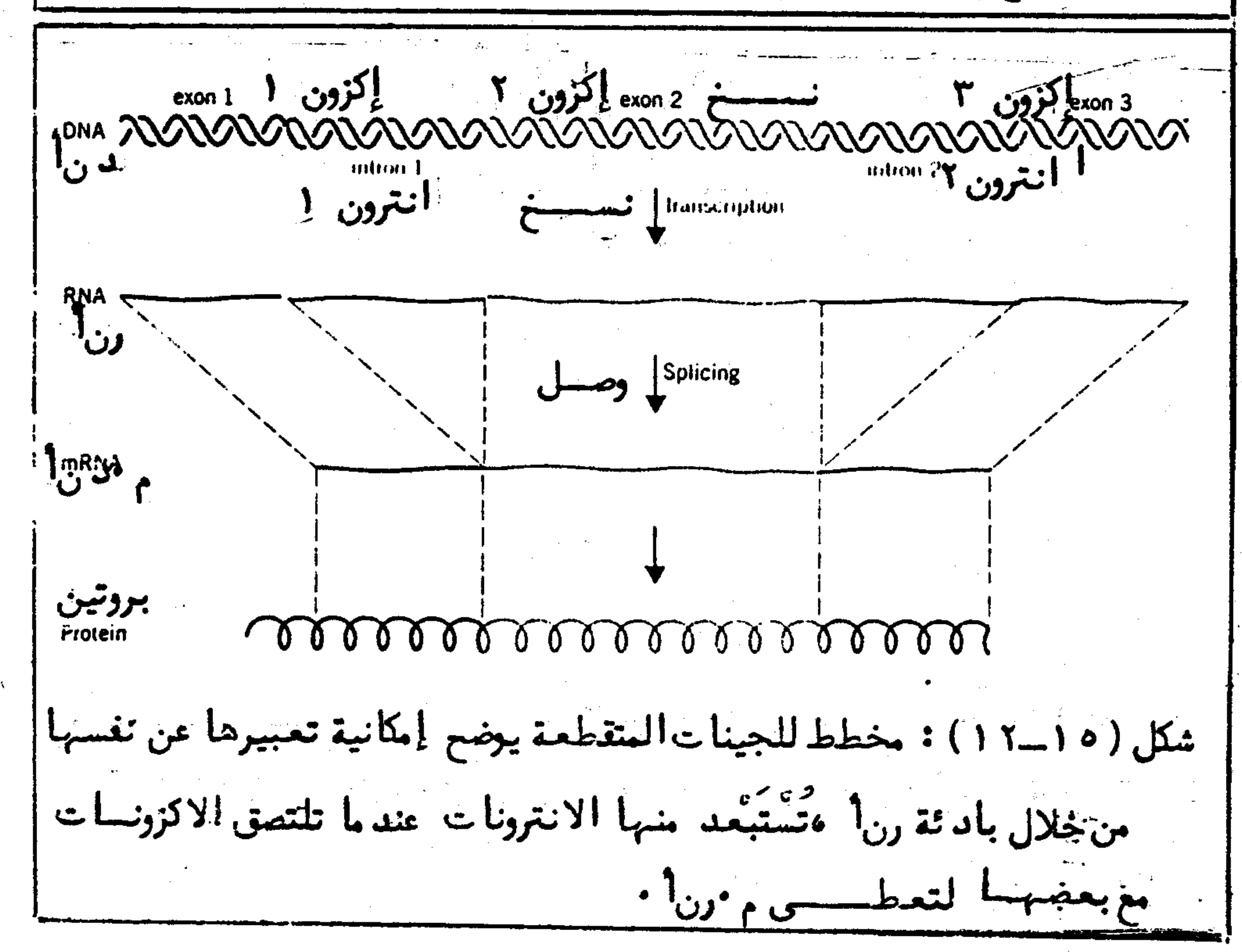
ويشمل جزئ ما من رن أ حامل الرسالة تتابعاً من النوتيدات يتوافق مع تتابع الأحماض الأمينية ،لكن الـ م •رن أ قد يحتوى على تتابعات إضافية فى كلا طرفيه • وهذه التتابعات لاتمثل البروتين مباشرة • وبالرغم من ذلك يعتبر "الجين" عادة بأنه يتكون من التتابع الكلى الممثل فى الـ م •رن أ • وفى بعض الأحيان توجد الطفرات التى تعوق وظيفة الجين فى المناطق الاضافية غير المُشَفَّرَة ،مما يؤكد الرأى القائل بأنّ هذه المناطق تكون جزءا حقيقيا من الوحدة الوراثية • ويصور الشكل (١٥–١١) الوضع السابق الإشارة إليه ، والذى يعتبر فيه أنّ الجين فى بدائيات النوى يتكون من امتداد مستمر من الـ د ن أ يلزم لانتاج بروتين معين وهو يشمل التتابع الذى يُشَفِّر لذلك البروتين، لكنه أيضا يشتمل على تتابعات على كلا طرفى منطقة التَشْفِير •

ثانيا : جينات الكائنات ميزات النوى : Eukaryotic Genes

قبل عام ١٩٧١ كان الاعتقاد السائد أن جينات ميزات النوى تتكون من تتابع نوتيدى لمقطع د ن أ يتوافق تماما مع الأحماض الامينية للبروتين الناتج من هذا الجين ،كما هو الحال فى جينات بدائيات النوى • ولقد تغير المفهوم البسيط للجين فى ميزات النوى بعد اكتشاف الجينات المتقطعة interrupted genes ، والتى أظهرتها تقنيات الهندسة الوراثة (خاصة الاستزراع الجينى) • وجاء الدليل الأول على وجود مقاطع منفصلة للجين فى الـ د ن أ من



شكل (١٥ـ١١) : رسم تخطيطى يوضح إمكانية كون الجين أطول من منطقة التتابـــع المُشَفِّـــر للبروتيـــــن .



شكل (١٥ـ١٢) : مخطط للجينات المتقطعة يوضح إمكانية تعبيرها عن نفسها من خلال بادئة رن أ تُستبعد منها الانترونات عندما تلتصق الاكزونـات مع بعضهـا لتعطـــى م رن أ .

تجارب المقارنة مابين التتابع النوتيدى لهذا الد ن أ والم ٠رن أ المقابل لـه ٠ فقد وجد ـ دائما ـ أن الم ٠رن أ يحتوى على تتابع نوتيدى يَتَناغَم تماما مع تتابع الأحماض الأمينية للناتج البروتينى له طبقا لقواعد الشِّفْرة الوراثية ٠ وعلى الرغم من ذلك فقد وجد أنّ الجين فى ميزات النوى قد يشتمل على تتابعات إضافية تقع داخل المنطقة الشِّفرية له ، وهى تعترض التتابع الذى يمثل البروتين ٠ ويعتبر التناقض مابين تتابع الد ن أ وتتابع الم ٠رن أ أمراً عاديا فى ميزات النوى ، كما وجد ذلك ـ أيضا ـ فى نوع البكتريا المسمى "أرْشِبَاكتريم archebacterium "(وهو يمثل فرعا تَطَوُّريا آخر من البكتريات) ، لكنه لم يكتشف على الاطلاق فى البكتريات (وهى التى تمثل الكائنات بدائيات النوى النموذجية) ٠

الإكزونات والإنترونات ووصل الم ٠رن أ : Exons, Introns and RNA splicing

تقسم تتابعات الد ن أ المكوِّنة لجين ميز النوى متقطع إلى قسمين كما هو موضح فى الشكل (١٥ـ١٢) :

الاكزونات: Exons وهى مناطق مُشَفَّرة coded لها مقاطع مقابلة ممثلة فى الم ٠رن أ ٠

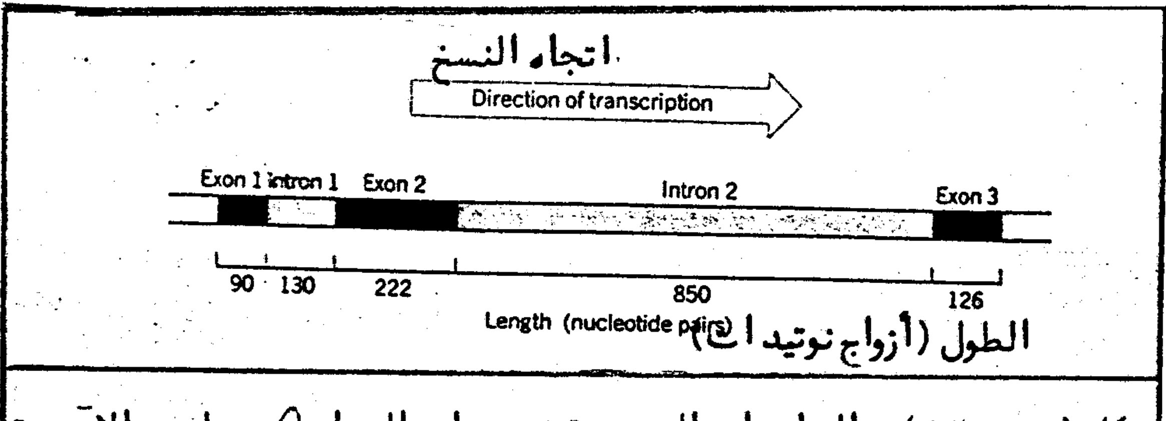
الانترونات: Introns وهى مناطق غير مُشَفَّرة غائبة فى الم ٠رن أ ٠

ولقد أثبتت بعض الدراسات أنّ بعض جينات ميزات النوى قد تحتوى على مايزيد عن ٥٠ إنترونا منتشرة على امتداد التتابع النوتيدى الكلى للجين، ولكن هناك جينات ـ مثل جين البيتا ـ جلوبين يحتوى على ثلاثة إكزونات واثنين من الانترونات (الشكل ١٥ـ١٣) ٠ ولذل فعملية الجين المتقطع فى

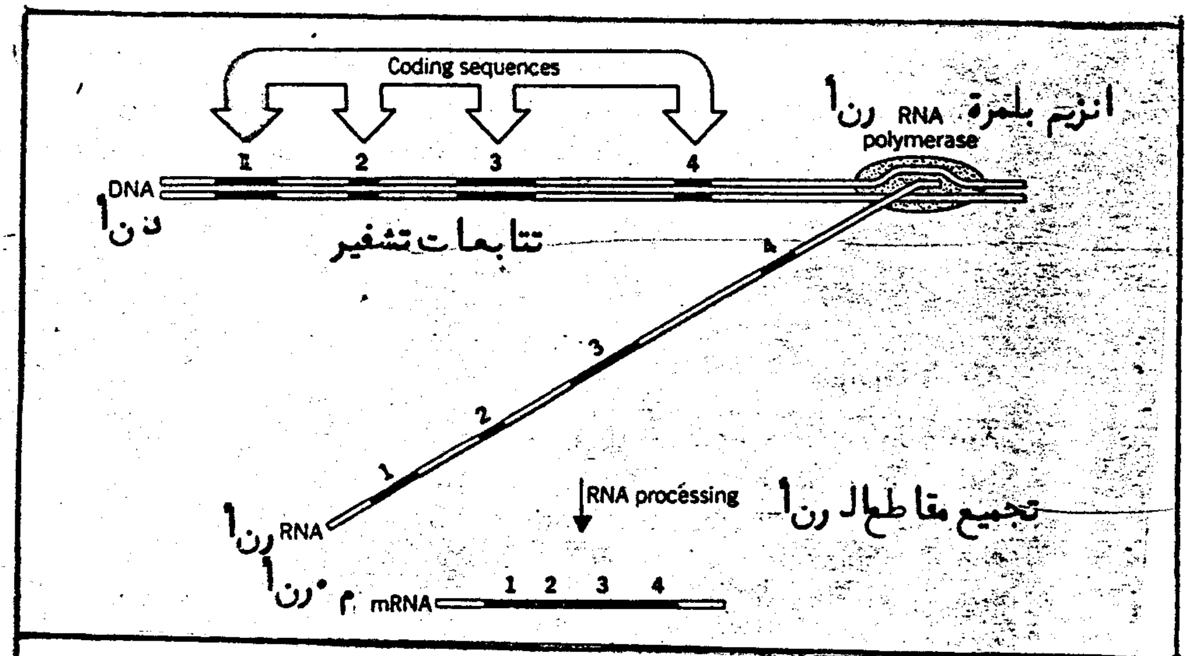
ميزات النوى تتطلب خطوة جديدة إضافية لا تحدث فى البكتريات الحقيقية "eubacteria" . ولقد وُجِدَ أنّ جزيئات الـ م . رن أ المُسْتَنْسَخَة transcribed من الجينات المحتوية على إنترونات ، تكون أطول كثيرا من جزيئات الـ م . رن أ التى تُخَلِّق البروتين المُحَدَّد بذلك الجين . والنوع الأول من جزيئات الـ م . رن أ يمثل تماما تتابع الجين لكنه مُجَرَّد بادئة ولا يستعمل كله فى تخليق البروتين . وتقترح إحدى النظريات وجود ميكانيكيات تعمل فى البداية على إزالة الإنترونات من الـ م . رن أ لكى تعطى م . رن أ ناضج مكون فقط من سلسلة من الإكزونات ، وتسمى هذه العملية بـ "وصل الـ رن أ RNA splicing" (الشكل ١٥ ـ ١٤) .

وتشير المعلومات السابقة إلى أنّ الجين يتكون من إكزونات تكون دائما متصلة مع بعضها بنفس الترتيب الذى تتواجد به فى الـ د ن أ . ومن ثم يظل التوازى الطولى colinearity للجين والبروتين محتفظا به مابين الاكزونات الفردية والأجزاء المقابلة لهمن سلسلة البروتين . كما أنّ ترتيب المواقع الطفرية داخل الجين يظل كما هو مماثلا لتنظيم استبدال الأحماض الأمينية فى البروتين ، لكن قد لا تتفق المسافات النسبية داخل الجين ـ على الاطلاق ـ مع المسافات فى البروتين . ويلاحظ أن جميع الاكزونات تكون ممثلة على نفس جزىء الـ م . رن أ ، كما أنّ وصلها مع بعضها يحدث كتفاعل داخلجزيئى intracellular reaction ، ولا يوجد وصل للاكزونات المحمولة بواسطة جزيئات م . رن أ مختلفة .

وتبين الدراسات الحديثة أنه فى الجينات المتقطعة لميزات النوى يبدو أن معظم الانترونات لا وظيفة لها ، حيث أنها تُسْتَبْعَد أثناء قيام الجين بالتعبير عن ذاته . ويُسْتَثْنَى من ذلك بعض الحالات وخاصة فى ميتوكوندريات الخميرة ، والتى وجد فيها أنّ إنتروناً بذاته يُشَفِّر لانتاج بروتين يؤدى وظيفته



شكل (١٥ـ١٣) : التتابعات المحشورة فى جينات البيتا β جلوبين الآدمية والاكزونات هى التى تشفر فقط للأحماض الأمينية فى البروتين .



شكل (١٥ـ١٤) : تنظيم التتابعات فى جين أحد الكائنات العليا .

تتوزع مناطق الـ د ن أ المشفرة للأحماض الأمينية داخل مناطق غير مشفرة حيث تُستبعد الأخيرة قبل تخليق الـ م . رن أ الناضج . تمثل المناطق من ١ـ٤ أجزاء من جين واحد . لاحظ أنه -فى الكائنات العليا- لايحدث ترابط مابين الـ م . رن أ والريبوسومات قبل انسلاخ الـ م . رن أ من الـ د ن أ بعكس الحال فى البكتريات (أنظر الباب ١١ ، الاشكال ١١ ـ ٥ و ١١ ـ ٦) .

مستقلا عن البروتين المُشَفَّر له بواسطة الاكزونات. ولقد وجد أنّ الطفرات في هذا الانترون تقع ضمن مجموعة تكاملية مختلفة عن تلك المجموعة الممثلة في الاكزونات.

والخلاصة هى أنه ليس من الضرورى أن تكون جينات الكائنات ميزات النوى جميعها متقطعة، فبعضها يتوافق مباشرة مع الناتج البروتينى كما هو الحال فى جينات البكتريات الحقيقية eubacterial genes. وحتى الآن لا تعرف نسبة الجينات المتقطعة إلى الجينات غير المتقطعة فى ميزات النوى، وإن كان يبدو أنّ الأولى قد تكون هى الغالبية العظمى من الجينات.

(٥) تكوين الأجسام المضادة فى نظم المناعة على ضوء تقنيات الهندسة الوراثية: Antibody Formation in Immuno-Systems

مقدمة عن الأجسام المضادة Antibodies: الأجسام المضادة هى بروتينات موجودة فى الدم يمكنها التعرف والارتباط بالمواد الغريبة، وهى لا توجد عادة فى الجسم. وتكوّن الأجسام المضادة جزءًا من نظام المناعة الذى يتكون من شبكة معقدة من الجزيئات البيولوجية والخلايا تحمى الكائن من العديد من الأمراض. وعندما يرتبط جسم مضاد مع مادة غريبة – وهى التى تسمى المولدة (أنتجين antigen) – يحدث تنشيط لعدة خطوات فى جهاز المناعة لهدم أو استبعاد الأنتجين. ولقد وُجد أنّ أعدادًا هائلة من الأنتيجينات يمكن أن تتعرّف عليها الأجسام المضادة. ولما كانت كل مُولِّدة يتم التعرف عليها بجسم مضاد مختلف، فلابد أن يكون الجسد قادرًا على تكوين ملايين مختلفة من طُرُز الأجسام المضادة.

تركيب الجسم المضاد : يتكون الجسم المضاد من أربع سلاسل من البروتين ،

سلستين ثقيلتين متطابقتين identical H-chains وسلسلتين خفيفتين متطابقتين identical L-chains وتنطوى هذه السلاسل وتترابط مع بعضها مكونة شكلا مماثلا للحرف "T" كما هو موضح فى الشكل (١٥ـ١٥) . ولقد بينت مقارنات تتابعات الاحماض الامينية للعديد من الاجسام المضادة المختلفة عدة خصائص هامة هى :

(أ) يمكن أن تُصَنَّف الاجسام المضادة إلى فئات على أساس تتابعات الاحماض الامينية وخصائصها فى السلاسل الثقيلة .

(ب) يوجد داخل كل فئة مقاطع من سلاسل البروتين متطابقة مع بعضها من جسم مضاد لآخر . وتسمى هذه المقاطع "المناطق الثابتة constant regio" وهى التى تُحَدِّد سلوك الجسم المضاد داخل الجسم . فعلى سبيل المثال نجد أن الاجسام المضادة ثقيلة السلاسل والتى لها طراز واحد من المناطق الثابتة ، يمكنها التحوّل فى الدم ، وفئة أخرى تشتمل على طراز آخر من المناطق الثابتة تلتصق بسطح الخلية المنتجة لها ، كما توجد فئات أُخَر ترتبط بخلايا محددة تفرز الهستامينات (histamines) .

(ج) وُجِد أنّ كل سلسلة خفيفة وكل سلسلة ثقيلة تحتوى على مناطق من الاحماض الامينية فريدة unique ومُمَيَّزة لكل جسم مضاد بذاته . وتسمى هذه المناطق "بالمناطق المتغيرة (Variable regions)" ، وهذه هى الاجزاء من الجسم المضاد التى ترتبط بالاجسام الغريبة التى تدخل الجسم مثل الفيروسات والبكتريات . ولما كان شكل وتركيب أىّ بروتين يتأثران بشكل كبير بالتغيرات البسيطة فى تتابعات الاحماض الامينية ، لذلك نجد أنّ التغيرات الطفيفة فى الاحماض الامينية الموجودة فى المناطق المتغيرة يترتب عليها تكوين

الملايين من الاجسام المضادة المختلفة ،كل واحد منها قادر على التعرّف على مولدة (أنتيجين) معـــين ٠

لقد تحير علماء البيولوجيا منذ فترة زمنية طويلة عن كيفية تكوين العديد من أنواع الاجسام المضادة ٠ هل من الممكن تواجد ملايين من الجينات بحيث يتحكم كل جين في سلسلة بروتينية مختلفة لكل جسم مضاد ؟ لكن الاحصاءات الحسابية تقترح أنّ خلايا الجسم البشرى لايمكنها أن تحوى د ن أ كافٍ ليُشفّر لسلاسل كل الاجسام المضادة ويتبقى جزء من الجينات ليقود بقية العمليات الكيميائية فى الخلية ٠ وتبين دراسات تحديد تتابعات الد ن أ ــ الآن ــ أنّ معظم خلايانا لاتحتوى على مجوعة كاملة من جينات الاجسام المضادة ٠ وبدلا من ذلك فهى تحتوى على قطع ومقاطع من الد ن أ يمكنها أن تؤلّف مع بعضها بطرق مختلفة ،بحيث يمكنها إنتاج ملايين من الاجسام المضادة المختلفة من كمية صغيرة من المادة الوراثية ٠ وتحدث هذه التوليفات داخل خلايا دم خاصة تسمى "الخلايا اللّمفاوية طراز ب B-lymphocytes"،وهى الخلايا المتخصصة فى تخليق الاجسام المضـــادة ٠

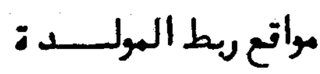
نظرية وصل الد ر ن أ لتخليق الاجسام المضادة :

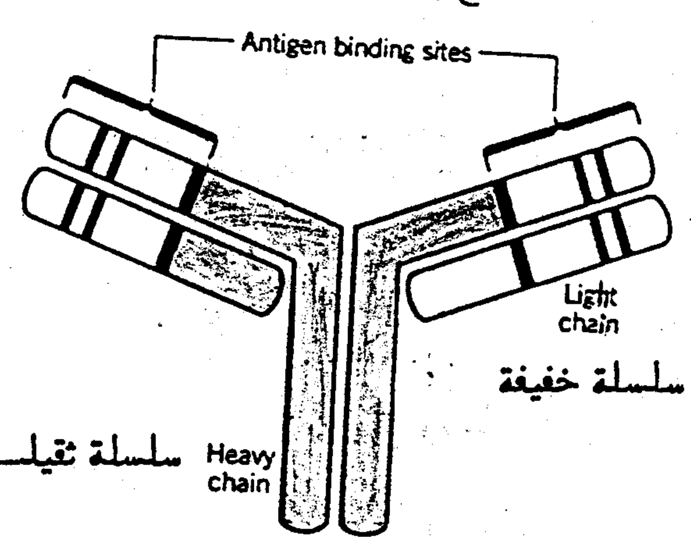
بمقارنة التتابعات النوتيدية فى الد ن أ المنقى من خلايا جنينية embryonic مع التتابعات الخاصة بالد ن أ المستخلص من الخلايا المنتجة للاجسام المضادة ،أمكن وضع تصور عام عن كيفية قيام التوليفات الجينية بتخليق سلاسل بروتينات الاجسام المضادة ٠ وكما يتضح من الرسم التخطيطى فى الشكل (٥ ــ ١٦) نجد ــ فى حالة سلاسل البروتين الخفيفة light chains أن خلايا الجنين تحتوى على عدة مئات من مناطق جينية متغيرة (V) منفصلة بمسافة كبيرة عن خمس جينات وصل قصيرة (J) ويحدث كسر ثم إعادة التحـــام

بحيث أن أحد الجينات V يوضع مجاورا لأحد الجينات J .

بعد ذلك يقوم إنزيم بلمرة الـ رن أ بنَسْخ هذه المنطقة ، ثم يستمر أيضا في نَسْخ المنطقة الثابتة للجين C . بعد ذلك يحدث لَصْق لجزئ الـ رن أ الطويل هذا ، لإزالة التتابعات بين المنطقتين V/J و C ، معطيا م . رن أ ناضج. ويعقب ذلك ترجمة للـ م . رن أ الى سلسلة خفيفة للجسم المضاد . ولما كان حوالى ١٥٠ من الجينات V يمكنها أن تتصل مع أيٍّ من ٥ جينات J ، لذلك يُقدَّر عدد التوليفات التى يمكن أن تحدث بحوالى ٧٥٠ توليفة (١٥٠ × ٥) . وعلاوة على ذلك نجد أنّ مواقع الوصل لم يمكن تحديدها بالضبط ، ومن ثم فالعدد الحقيقى للتوليفات الممكنة يحتمل أن يكون قريبا من ٧٥٠٠ توليفة .

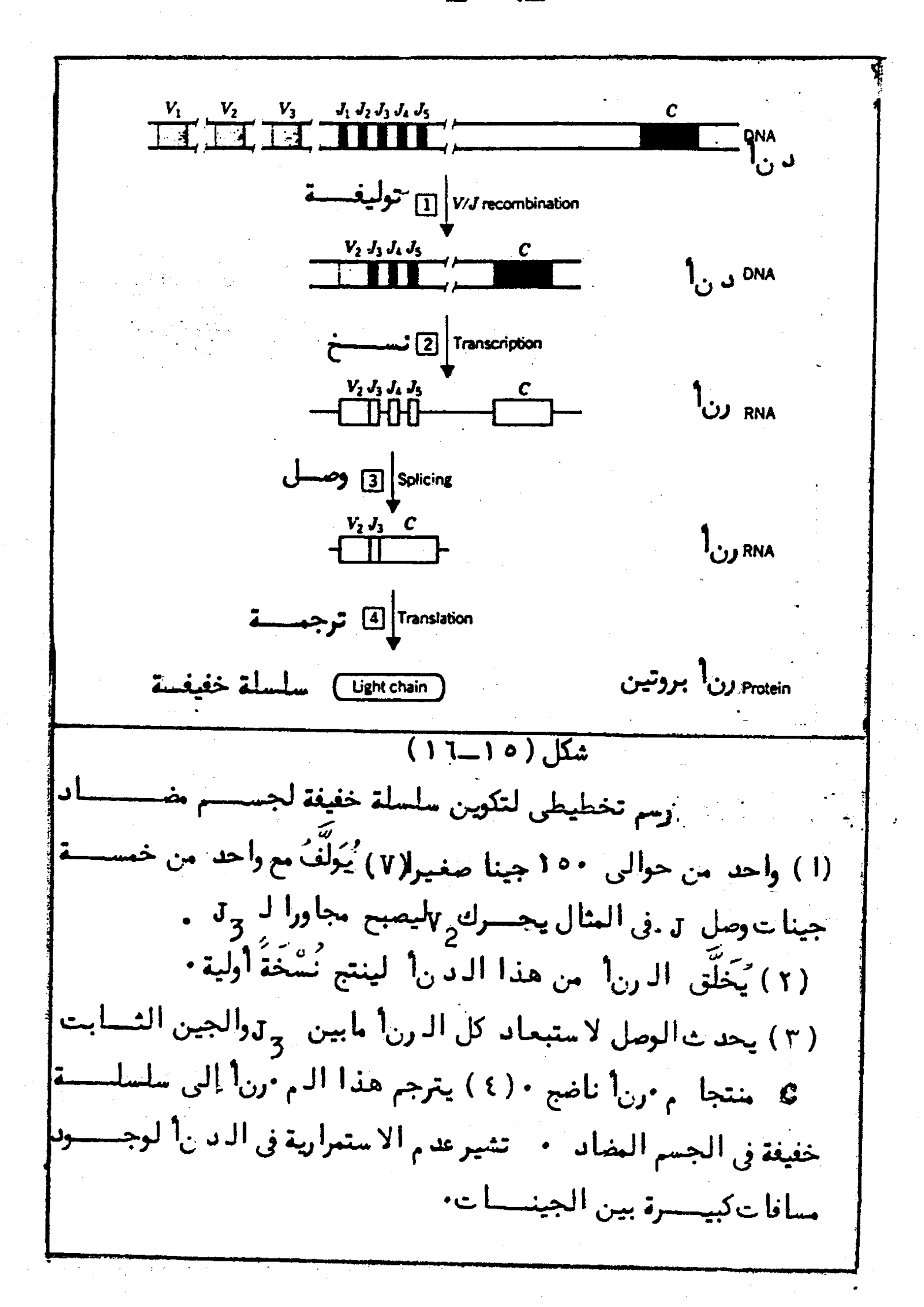
وتنطبق نفس الأسس السابقة بالنسبة لسلاسل البروتين الثقيلة heavy chains للأجسام المضادة ، بالاضافة إلى أنه توجد عناصر وراثية أكثر تشترك فى تخليق تباينات. هذه السلاسل الثقيلة (الشكل ١٥ ـ ١٧). وتشير نتائج البحوث إلى أنه يوجد فى الآدميين حوالى ٨٠ جينا متغيرا V (Variable genes) وحوالى ٥٠ جينا مختلفا D (diversity) و ٦ جينات وصل J (Joining genes) وبناء على ذلك يمكن أن تتكوّن حوالى ٢٤٠٠٠ توليفة (٨٠×٥٠×٦) . كما أن المرونة flexibility فى الوصلات V/D و D/J ، من المحتمل أنها تضيف حوالى ١٠٠ طريقة لتوليف الجينات ، لذلك فإنّ العدد الكلى لتوليفات السلاسل الثقيلة يُقَدَّر بحوالى ٢٫٤ مليون توليفة (٢٤٠٠٠ × ١٠٠) . ويلاحظ أنّ العدد الكلى لتوليفات الأجسام المضادة هو محصلة توليفات السلاسل الخفيفة والسلاسل الثقيلة ، ويقدر بحوالى ١٨ بليون توليفة (٧٥٠٠ × ٢٫٤ م) . ومن ثم يمكن القول بأن كمية هائلة للغاية من الأجسام المضادة يمكن أن تتكون بواسطة حوالى ٣٠٠ مقطع من الـ د ن أ الجنينى .





شكل (١٥_١٥)

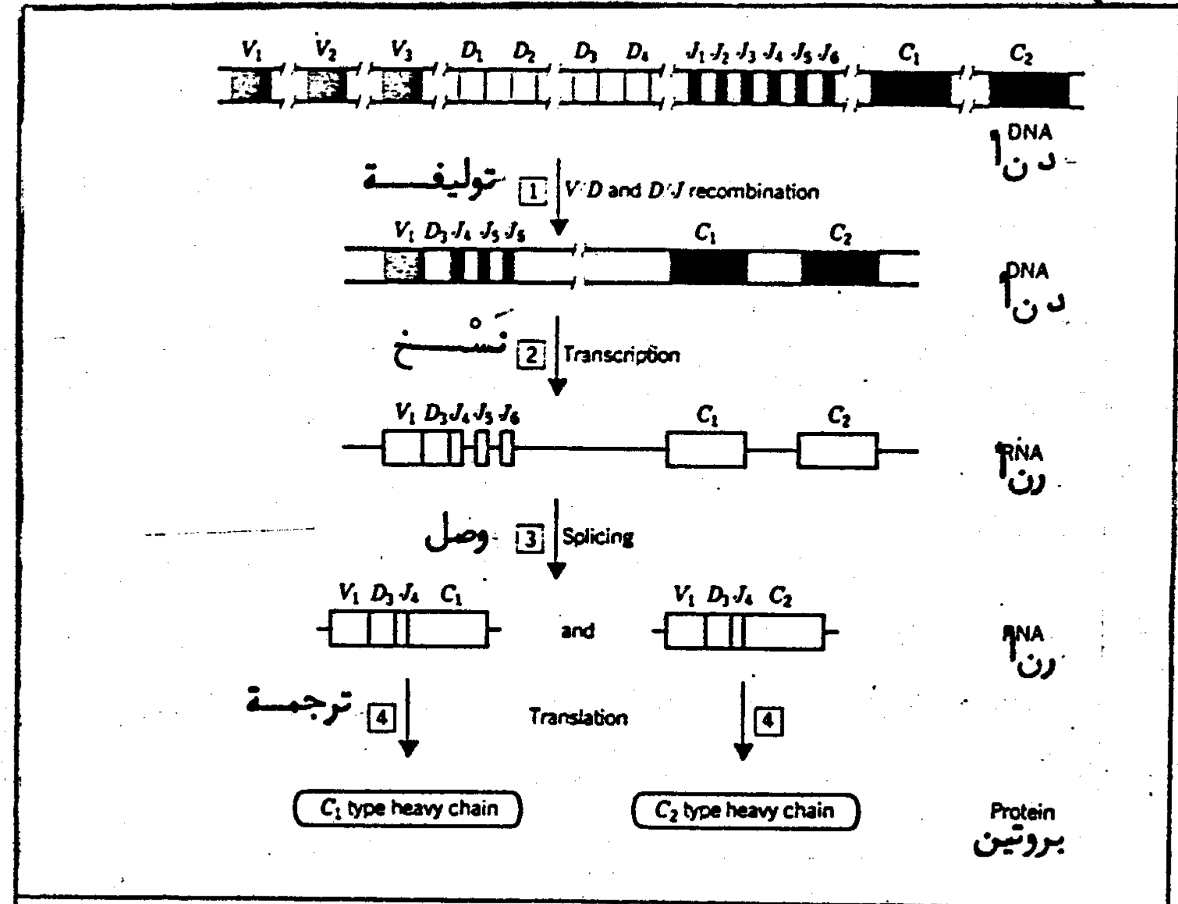
رسم تخطيطى لجزىء جسم مضاد (antibody). تتزاوج سلسلتان ثقيلتان مع بعضهما وكذلك مع سلسلتان خفيفتان لتكوّن جسماً مضاداً فعّالاً. تتابعات الأحماض الأمينية مقسمة إلى مناطق ثابتــة constant (المظللة) ومناطق متغيرة variable (بيضــاء) ومناطق شديدة التغير hypervariable (أسود). يوجد موقعا ربــط مع الانتيجين (المولدة) ، واحــد فى المنطقة المتغيرة لكل ذراع.



شكل (١٥-١٦)

رسم تخطيطى لتكوين سلسلة خفيفة لجسم مضاد.

(١) واحد من حوالى ١٥٠ جينا صغيرا (V) يُوَلَّفُ مع واحد من خمسة جينات وصل J . فى المثال يجرك V_2 ليصبح مجاورا لـ J_3 .
(٢) يُخَلَّق الرنأ من هذا الدنأ لينتج نُسْخَةً أولية.
(٣) يحدث الوصل لاستبعاد كل الرنأ مابين J_3 والجين الثابت C منتجا م رنأ ناضج. (٤) يترجم هذا الم رنأ إلى سلسلة خفيفة فى الجسم المضاد. تشير عدم الاستمرارية فى الدنأ لوجود مسافات كبيرة بين الجينات.



شكل (١٥-١٧) رسم تخطيطى لتكوين سلسلة ثقيلة لجسم مضـــاد ·

(١) واحد من ٨٠ منطقة (V) يتصل مع حوالى ٥٠ منطقة D وواحـــدة من المناطق J الست لتكون توليفة من الـ د ن أ فى خلية تسمى الخلية الليمفاوية B · (٢) تخلق نسخة أولية تحتوى على منطقتين مختلفتين C (٣) بواسطة التلاصق التفضيلى differential splicing، يمكـــن أن يتكون طرازان من م·رن أ السلاسل الثقيلة ·

(٤) عند ما تترجم جزيئات الـ م·رن أ ، فانـها تعطى طرازين من سلاســل البروتين الثقيلة · ولما كانت المناطق $V_1/D_3/J_4$ هى نفسهـــا للاثنتين ، فان السلسلتين الثقيلتين من البروتين سوف تحتويـــان علـى مناطق ربط متطابقة للانتيجينات · تشير عدم الاستمرارية فى الـــد ن أ لوجود مسافات كبيـــرة بين الجينـــات·

وكما ذكرنا سالفا ،توجد عدة طرز من السلاسل الثقيلة ،كل واحدة بمنطقة ثابتة constant region مختلفة • وهذه المناطق الثابتة هى التى تُحَدِّد كيفية سلوك الجسم المضاد فى جسد الانسان • ويلاحظ أنّ الجينات ذات المناطق الثابتة تكون منتظمة أسفل المجرى downstream من المنطقة J ، وبواسطة طرق الوصل التفضيلية selective splicing وأحداث التوليفات الجديدة الإضافية ،من الممكن وضع المنطقة المتطابقة V/D/J فى خمس مناطق ثابتة مختلفة • ويترتب على ذلك أنّ جسم الانسان يمكنه أن يحتوى على عدد من طُرُز الأجسام المضادة يمكنها أن تتعرّف على نفس المادة الغريبة لكنها تسلك سبلا مختلفة لمقاومتها •

كيفية قيام جهاز المناعة فى الجسم الآدمى بوظائفه :

يمكن تلخيص قيام جهاز المناعة الآدمى بوظائفه الحيوية فى الجسم البشرى (وأيضا فى بعض الحيوانات العليا) ،بناء على المعلومات المعروضة فى الجزء السابق ،فى الخطوات التالية :

(١) يحتوى دم الانسان على ملايين من الخلايا الليمفاوية من الطراز B التى تتجول فيه • وتقوم كل خلية بتبديل طفيف فى محتواها من الـ د ن أ. ويترتب على ذلك أن تقوم كل خلية بإنتاج جزئ جسم مضاد مختلف قليلا عن الأجسام المضادة التى تنتج بواسطة الخلايا الليمفاوية B الأُخَر •

(٢) تقوم كل خلية بانتاج عدة فئات من الأجسام المضادة ،وتحتوى كل فئة على مناطق ثابتة مختلفة للسلاسل الثقيلة • ووظيفة إحدى هذه الفئات هى أن تُسَكَّن على سطح الخلية الليمفاوية B التى تنتجها ،وفى هذه الحالة يسلك الجسم المضاد كحارس sentry منتظرا القيام بحصار مادة غريبة •

(٣) عند ما يهاجم الجسم المضاد الموجود على سطح الخلية مولدة (أنتيجينا antigen) يمكنه الارتباط بها ،يتكون معقد complex مابين الانتيجن والجسم المضاد . بعد ذلك يقوم المعقد بدفع هذه الخلية الليمفاوية للتكاثر لتنتج جزيئات إضافية من الجسم المضاد . ويلاحظ أنّ جميع الأجسام المضادة المُخَلَّقة من خط خلوى cell line محدّد تشمل مناطق متغيرة متطابقة ، لذلك فجميعها يتعرّف على نفس المولدة (الأنتجن) . وبالرغم من ذلك قد تختلف المناطق الثابتة ،لذلك تتكون أجسام مضادة تعمل بطرق مختلفة لتُخلِّص أجسادنا من المولدة .

(٤) هناك بعض الأجسام المضادة يمكنها التعرف على جزء من مادة غريبة ، بينما أجسام مضادة أُخَر قد تتعرّف على الأجزاء الأُخَر من هذه المادة ،لذلك فإنّ المركب المعقد –كفيروس مثلا– يمكنه أن يستحث stimulate عدداً من الخلايا الليمفاوية "ب" لانتاج أجسام مضادة عديدة ،مما يزيد من احتمال المقاومة للاصابة .

وقد استعملت تقنيات الاندماج الخلوى cell fusion (وهى إحدى تقنيات الهندسة الوراثية فى الكائنات الراقية الحيوانية والنباتية) بنجاح فى إنتاج الهيبريدومات Hybridomas الهجن الخلوية) والتى تعطى كل منها طرازاً واحداً محدداً من الأجسام المضادة وحيدة الكلون mono-clonal antibody .وسوف نتناول هذا الموضوع بشئ من التفصيل فى جزء لاحق من هذا المرجع ، لأهميته من الناحية التطبيقية الطبية والبيطرية .

(٥) خرائط التحديد : Restriction Maps

مقدمـــة :

لقد أمكن استخصلاص إنزيمات الاندونيوكلييز المُحَــدِّدَة restriction enzymes من عدد كبير من أنواع البكتريات . ويبدو أنّ هــذه الانزيمات تمثل جزءاً من ميكانيكية الدفاع الطبيعية التى تحمى الخلايا البكتيرية ضدّ أىّ غزو بواسطة جزيئات د ن أ غريبة مثل تلك الموجودة فى الفيروســات. وأحد العناصر الهامة لميكانيكيــة الدفاع هذه ، هو أنّ إنزيم النيوكلييز يجب أن يُفَرِّق مابين د ن أ الخلية والد ن أ الغريب الذى يدخل هذه الخليـــة ، وإلاَّ لكانت الخلية تُتْلِف الد ن أ الخاص بها . وتشمل عملية التَعَرُّف عنصريـــن أساسييـــن :

الاول : هو تواجد تتابعات قواعد مُحَدَّدَة تعمل كأهداف لإنزيم النيوكلييـز .

الثاني : هو أنّ الخلية تكون قادرة على وضع إشارات كيميائية واقية على جميع تتابعات القواعد المستهدفة والتى يتصادف تواجدها فى الد ن أ الخـــاص بها . وتُحَوِّر الاشارة الد ن أ وتمنع إنزيم النيوكلييز من القَطْع . وتفتقر جزيئـات الد ن أ الغريبة إلى الاشارات الواقية حيث يتم مهاجمتها بإنزيمات النيوكلييـز مالم تكـن هذه الجزيئات آتية من خلايا تكون قد وَضَعَت عليها هذه الاشـارات الواقية الصحيحة . ويترتب على ذلك أنّ إنزيمات الإندونيوكلييز المُحَــدِّدَةـــ الموجودة فى كائنات مختلفة ـ تَتَعَرَّف على تتابعات مستهدفة مختلفة . ومـن ثَمَّ فإنّ هذه الانزيمات والمُنقَّاة من كائنات مختلفة قد أصبحت وسائل إنزيميــة يمكن استعمالها عند مواقع مختلفة من الد ن أ .

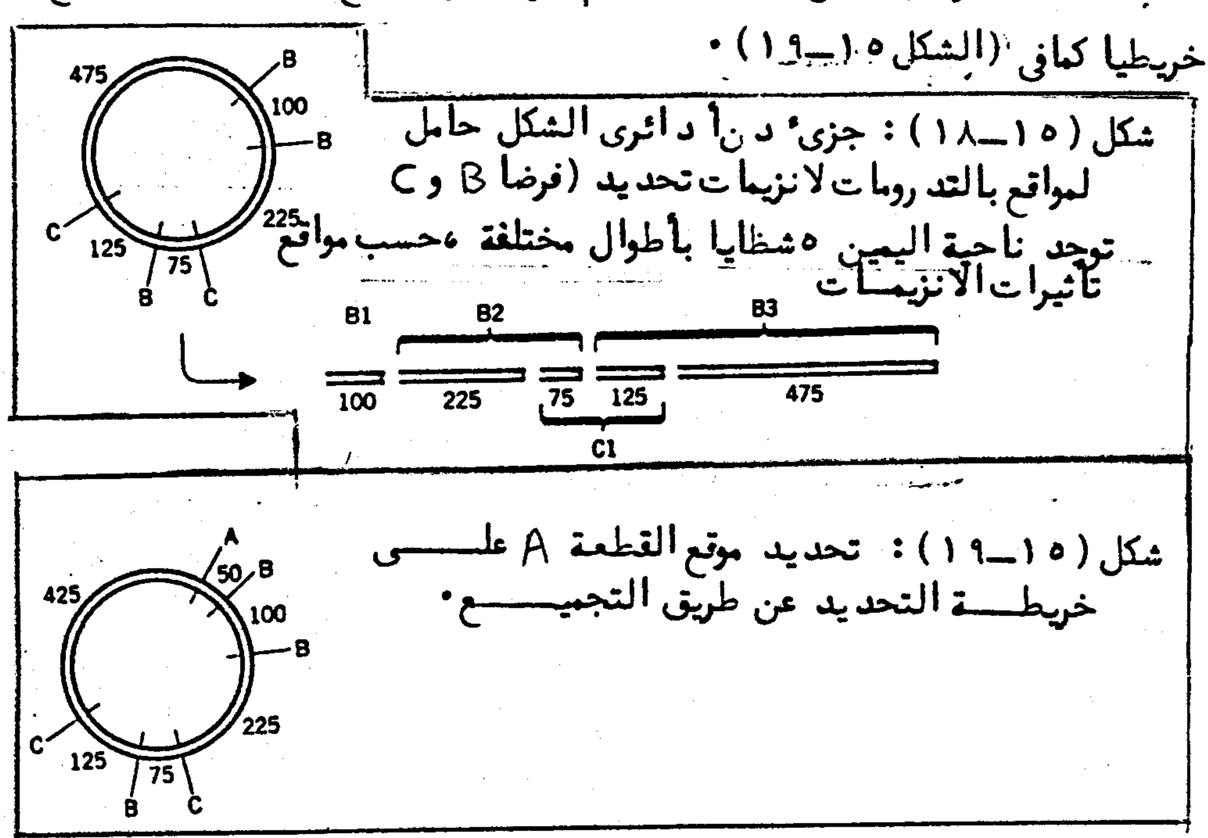
وبالإضافة إلى دورها فى عمليات تقطيع الد ن أ ، فإنّ إنزيمـــــات الاندونيوكلييز المُحدِّدة تلعب دوراً هاماً فى تحليل التتابعات النوتيديـــة

لجزيئات الد ن أ . وتشمل الخطوة الأولى فى هذه التحليلات تشييد خريطة تحديد (a restriction map) ، وهذه سوف نسردها فيما يلى حتى نتعوّد على التعامل مع هذه الانزيمات:

أولا : نفترض أنّ لدينا جزيئا دائريا من الد ن أ (كالمصور فى الشكل ١٥-١٨) ويرغب المهندس الوراثى فى رسم خريطة تحديد له .

ثانيا : يقوم المهندس الوراثى باستعمال توليفة تتكون من أكثر من إنزيم تحديد ولتكن هذه الانزيمات - مثلا B و C - لتقطيع جزىء الد ن أ تحت الدراسة . ولنفرض أنّ هذه العملية أعطت خمسة مقاطع هى ٧٥ ، ١٠٠ ، ٢٢٥ و ٤٧٥ وحدة قياسية . فإذا فُرض أنّ الانزيم B أعطى ثلاثة مقاطع هى B1 (١٠٠ وحدة) و B2 (٣٠٠ وحدة) و B3 (٦٠٠ وحدة) وأنّ المقطعين B2 و B3 لم يظهرا فى التحليل . حينئذ يعنى ذلك أن الطراز C من إنزيم التحديد قد أحدث قَطْعَتَين cuts ، واحدة فى المقطع B2 والأخرى فى المقطع B3 . وباضافة الشظيتين fragments (بالأطوال ٧٥ و ٢٢٥ وحدة - الشكل ١٥-١٨) . نجد أنّ مجموعهما هو ٣٠٠ وحدة وهذا يتوافق مع طول المقطع B2 . ويستنتج من ذلك أنّ الانزيم C يعطى قَطْعَة cut طولها ٧٥ وحدة من إحدى نهايات المقطع B2 . وبالمثل نجد أنّ مجموع الشظيتين ١٢٥ و ٤٧٥ يساوى ٦٠٠ وحدة وهو طول المقطع B3 . من ذلك يُسْتَنْتَج أنّ الانزيم C قد أحدث قطعة cut أخرى طولها ١٢٥ وحدة من إحدى نهايتى المقطع B3 . ولما كانت القطعتان cuts الناتجتان من الانزيم C تبعتدان عن بعضهما إما بـ ٢٠٠ أو ٨٠٠ وحدة قياسية على الخريطة الدائرية المصاحبة ، لذلك لاتوجد إلا طريقة واحدة لأنْ تتوافق بها الخريطة (الشكل ١٥-١٨) .

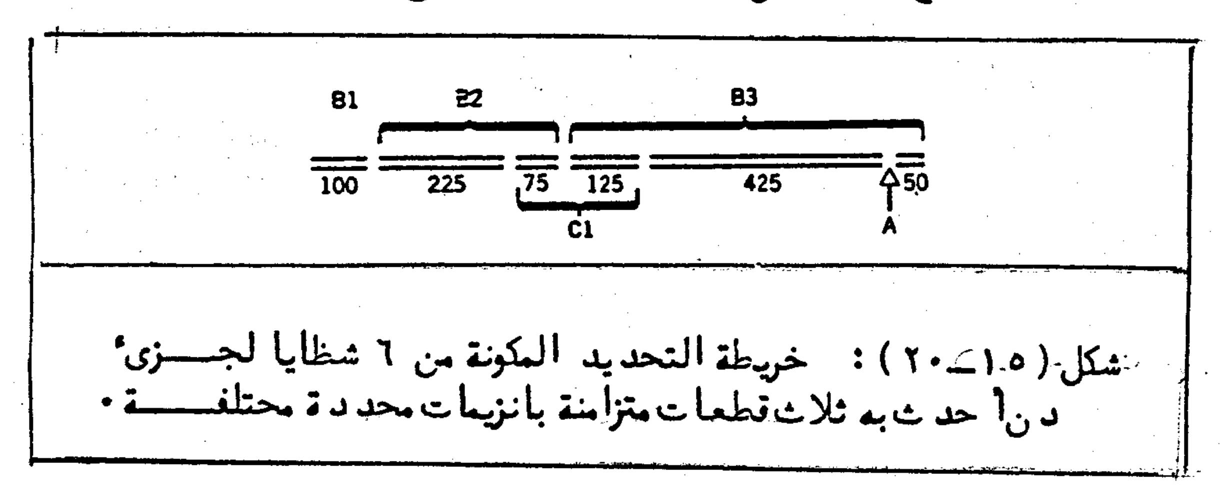
ثالثا : باضافة النتائج من التوافيق C + A و B+ A و C + B يكون من الممكن تحديد موقع القطعة (cut) A (الشكل ١٥ـ١٩) • ولما كانت القطعة (cut A) A فى المقطع B3 على بعد ٥٠ وحدة فقط من احدى القطعات B وبعيدة عن قطعات الانزيم C ،فان الموقع A لابد وأن يقع خريطيا كمافى (الشكل ١٥ـ١٩) •



شكل (١٥ـ١٨) : جزىء د ن أ دائرى الشكل حامل لمواقع بالتدرومات لانزيمات تحديد (فرضا B و C) توجد ناحية اليمين ٥ شظايا بأطوال مختلفة ،حسب مواقع تأثيرات الانزيمات

شكل (١٥ـ١٩) : تحديد موقع القطعة A على خريطة التحديد عن طريق التجميع •

رابعا : عندما تحدث الطرز الثلاثة من القطعات فى وقت متزامن فلسوف تنتج ستة شظايا كما يتضح من الشكل (١٥ـ٢٠) التالى :



شكل (١٥ـ٢٠) : خريطة التحديد المكونة من ٦ شظايا لجزىء د ن أ حدث به ثلاث قطعات متزامنة بانزيمات محددة مختلفة •

خامسا : يقاس حجم كل شظية من شظايا الـ د نأ الناتجة عقب المعاملة باستخدام تكنيك التفريد الكهربى فى الجِلّ (gel electrophoresis) ، والذى يمكن تلخيصه فى النقاط التاليـــــة :

(١) تُجَهَّز شرائح الجِلّ (من الاجاروز أو من الاكرايل أمايد) .

(٢) يعمل مجرى well فى الجِلّ ، حيث يوضع بها مخلوط من شظايا الـ د نأ.

(٣) عن طريق مصدر طاقة كهربية a power supply يدفع مجال كهربى electric field فى الجِلّ مما يدفع جزيئات الـ د نأ للتحـــرك خلالـــــه .

(٤) يلاحظ أنّ جزيئات الـ د نأ متساوية الحجم تتحرك مع بعضها كمجموعة واحدة وتها جر الجزيئات الاصغر بدرجة أسرع خلال الجل عن الجزيئات الاكبـــر .

(٥) عقب انتهاء عملية التفريد الكهـربى يتم صبغ الجل بصبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide) .

(٦) بالفحص على مسطح زجاجى بخلفية من الضوء مافوق البنفسجى -UV light يمكن رؤية العديد من شظايا الـ د نأ الصنوية على شكل شريط band فلورستى (الشكل : ٥١-٢١) .

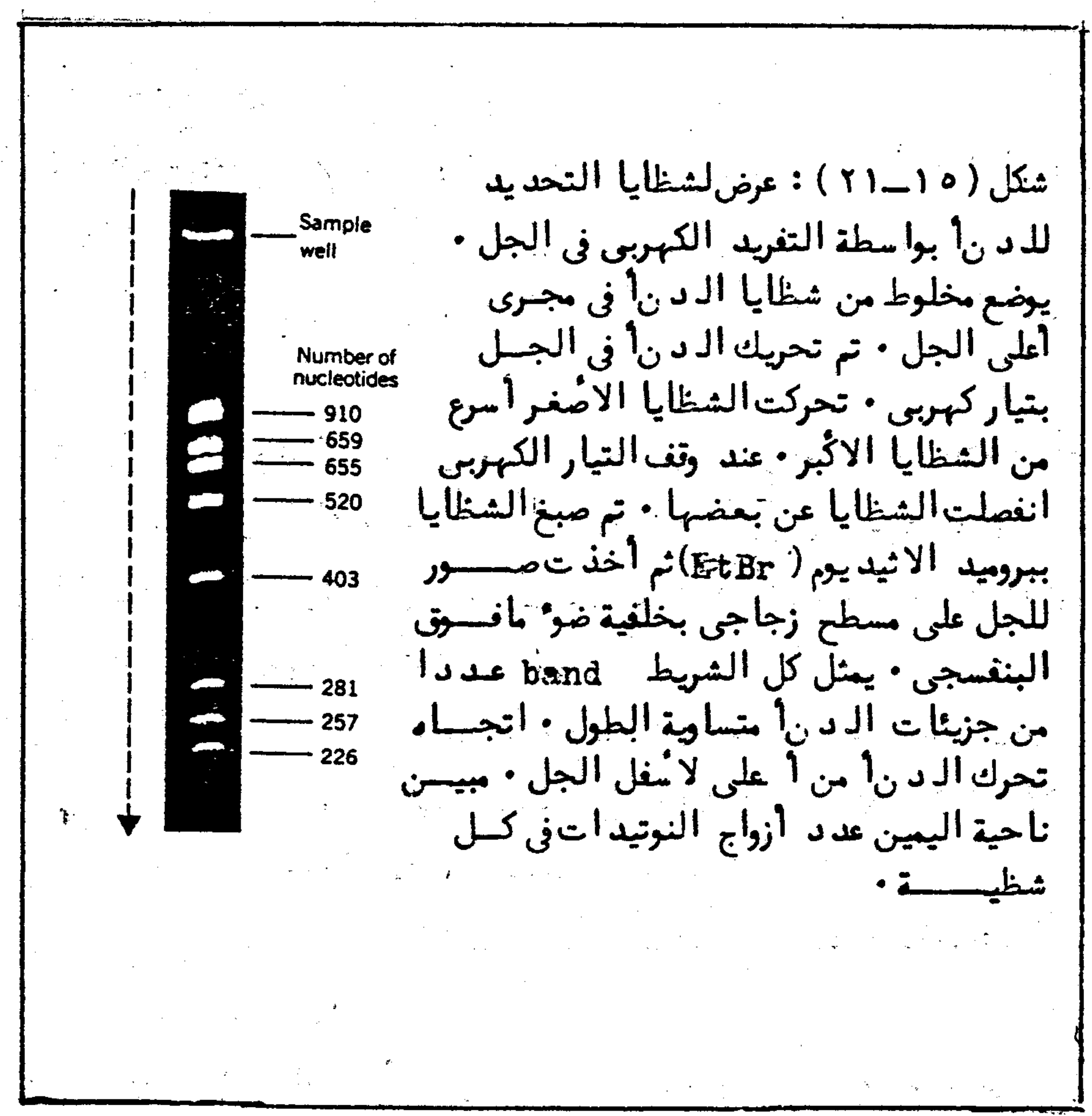
(٧) تعطى الشظايا ذوات الاطوال المختلفة شرائط مختلفة الكثافة والمسافـة (الشكل : ٥١-٢١) .

(٨) يُحَدَّد طول الـ د نأ فى كل شريط (band) بمقارنة بعده النسبـــى بشرائط الـ د نأ القياسية standard المعروف أطوالها النسبيـــة مُسْبَقاً والتى تُسَكَّن فى نفس الجل كطراز قياســـى .

(٩) إذا تواجدت كمية كافية من شظايا الـ د نأ الصنوية فى شريط تفريد ما ، يمكن استخدام طرق كيميحيوية خاصة لتحديد تتابعات القواعد فيهـــا .

(١٠) بمعرفة التنظيم الخريطى (map order) لشظايا الـ د نأ (باستعمال المنطق السابق الاشارة إليه) من الممكن أن تُنَسَّق مع بعضهـــا

التتابعات النوتيدية القصيرة من كل الشظايا ـ مثل أحجية الصور المقطوعة (jigsaw puzzle) ـ مما يترتب عليه فى النهاية الحصول على التتابع النوتيدى لكل جزئ الد ن أ ٠



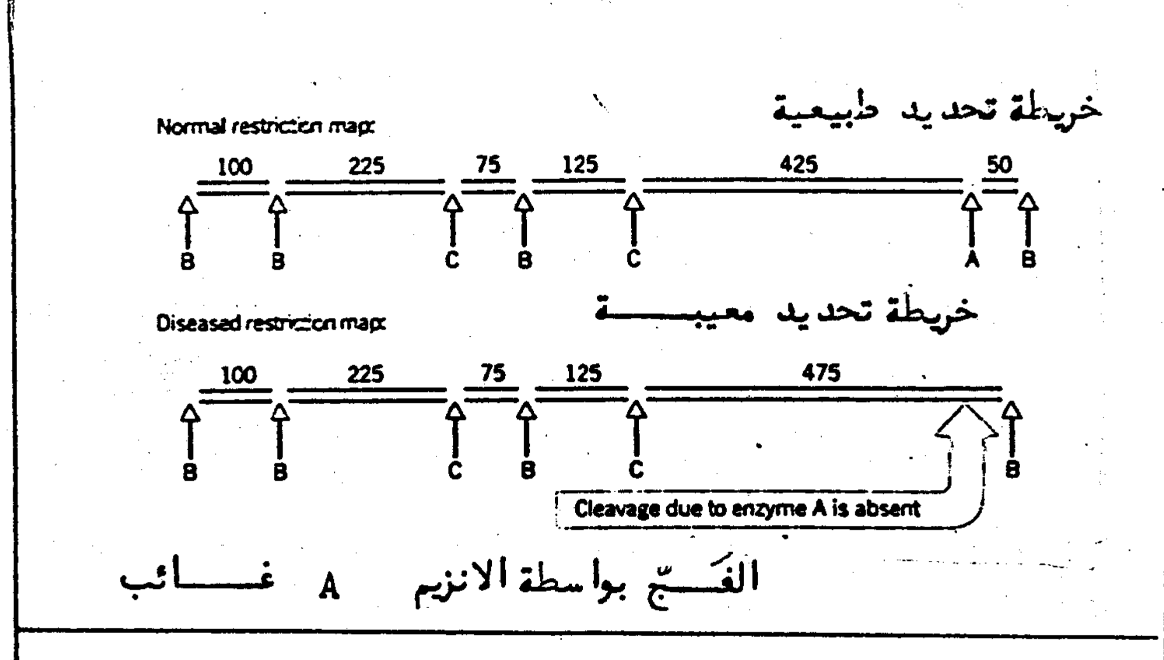
شكل (١٥ـ٢١) : عرض لشظايا التحديد للد ن أ بواسطة التفريد الكهربى فى الجل ٠ يوضع مخلوط من شظايا الد ن أ فى مجرى أعلى الجل ٠ تم تحريك الد ن أ فى الجل بتيار كهربى ٠ تحركت الشظايا الاصغر أسرع من الشظايا الاكبر ٠ عند وقف التيار الكهربى انفصلت الشظايا عن بعضها ٠ تم صبغ الشظايا ببروميد الاثيديوم (EtBr) ثم أخذت صور للجل على مسطح زجاجى بخلفية ضوء مافوق البنفسجى ٠ يمثل كل الشريط band عددا من جزيئات الد ن أ متساوية الطول ٠ اتجاه تحرك الد ن أ من أعلى لاسفل الجل ٠ مبين ناحية اليمين عدد أزواج النوتيدات فى كل شظية ٠

خرائط التحديد كوسيلة لتشخيص بعض الأمراض الوراثية للأجنة قبل الولادة :

Restriction mapping as a diagnostic tool for prenatal detection of certain genetic diseases.

تمثل خرائط التحديد احدى التقنيات الحديثة التى وفرتها سبل الهندسة

الوراثية لتشخيص أمراض النقص الوراثية فيما قبل الولادة . فعلى سبيل المثال في مرض أنيميا الخلايا المنجلية sickle cell anemia نجد أن تَغَيُّرا طفيفا يشمل قاعدة نوتيدية واحدة (أنظر الطفرة على المستوى الجزيئى ـ الباب الخامس) فى تتابع قواعد الجين المسيطر على تخليق الهيموجلوبين ، هو المسئول عن هذا المرض. ولقد وجد أنّ هذا التغير يحدث داخل بالندروم موقع تَعَرّف recognition site لأحد إنزيمات الاندونيوكلييز المحددة ، بحيث تَبَدَّل هذا الموقع ولم يَعُد فى الامكان التعرّف عليه بواسطة الانزيم .ومن ثَمّ لايستطيع الانزيم أن يقطع فى هذا الموقع . ويترتب على ذلك أن خريطة التحديد للدنأ المعزول من جنين مصاب بالانيميا تختلف عن خريطة التحديد للدنأ من فرد سليم . ويوضح الشكل (١٥-٢٢) مخططا كمثال لخريطة تحديد لفرد مصاب مقارن بآخر سليم . ويوضح هذا المثال أنّ التغير فى القواعد المسبب للمرض يحدث فى موقع التعرف للطراز A لانزيم التحديد ، مستبعدا ذلك الموقع من خريطة الدنأ . وبناء على ذلك ، يمكن تمييز خريطة التحديد للجنين المصاب بسهولة عن تلك الخاصة بالفرد المعاف ، حيث تُسْتَبْدَل شظيتان (بأطوال ٤٢٥ و ٧٥ وحدة قياسية فى الفرد السليم) بشظية جديدة (طولها ٤٧٥ وحدة قياسية) تتواجد فى الدنأ الطافر (للفرد المصاب) .



شكل (١٥ـ٢٢)

رسم تخطيطى لتشخيص مرض وراثى بواسطة خرائط التحديد.
مبين مثال فرضى لتغير فى تتابع النوتيدات فى الد ن أ يسبب مرضا وكذلك يستبعد موقعا للتحديد (موقع لتأثير الانزيم A) . ومن ثم فالد ن أ المعزول من خلية من فرد مريض يكون له خريطة تحديد مختلفة. تحمل خلايا الكائنات العليا كالانسان نسختين من كل جزئ من الد ن أ واحدة آتية من الأب والأخرى من الأم . وبالرغم من أن هذين الجزيئين ليسا صنوين على مدى طولهما ، لكنهما قد يكونا صنوين فى المنطقة تحت الاختبار . وإذا فرض أنه فى المنطقة المختبرة كان جزيئا الد ن أ آتيان من أبوين كليهما عادى (normal) أو كليهما مصاب (pathogenic) ، فان التحليل يعطى النتائج الموضحة فى الرسمين التخطيطيين أعلاه . أما إذا كان الد ن أ عاديا من أحد الأبوين ، لكن الد ن أ من الأب الآخر كان مصابا فانه يلاحظ وجود خليط من شظايا الد ن أ . ومن المعروف أن أنيميا الخلايا المنجلية تنتج من تغير يشمل نوتيدة واحدة فى الد ن أ . وأصبح الآن فى الامكان تشخيص المرض بفحص واختبار خرائط التحديد لد ن أ الجنين قبل الولادة .

(الباب السادس عشر)

التطبيقات العملية لتقنيات الهندسة الوراثية ورفاهية الجنس البشرى

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

فى السنوات القليلة الماضية بعد التقدم المثير فى تكنولوجيا الد ن أ المطعم Recombinant DNA Technology اتسعت دائرة محاولات التطبيقات العملية للهندسة الوراثية لتشمل كل صور الحياة الراقى منها والدنيء • فبالاضافة إلى ما سبق ذكره فى الأبواب السابقة نوجز فيما يلى بعضا من التطبيقات التى تحققت أو يسعى العلماء الى تحقيقها :وسوف نتناول بعضها بشيء من التفصيل فى أجزاء لاحقة •

أولا : فى المجالات الطبية والدوائية :

١ ـ فى عام ١٩٨٥ تمكن علماء الهندسة الوراثية فى الولايات المتحدة وفرنسا من إنتاج عقار طبى جديد لمقاومة السرطان ، اطلق عليه اسم " انتركولين ـ ٢ " وهو مادة بروتينية تنتجها خلايا متخصصة فى جهاز المناعة الآدمى ، وذلك عن طريق استزراع جينات المناعة الآدمية فى خلايا بكتيرية باستخدام هندسة الجينات •

٢ ـ فى عام ١٩٨٥ فاز العالمان جولد شتين وبراون بجائزة نوبل للعلوم الطبية والبيولوجية واللذان تمكنا من انتاج نوع من البروتين الطارد للكوليسترول من دم الانسان ـ والذى اطلق عليه اسم "LDL" وهو يستعمل فى علاج الجلطات التى قد تتكون فى الأوعية الدموية وذلك بتخليق هذا البروتين عن طريق استزراع الجينات الآدمية فى الخلايا البكتيرية •

٣ ـ في يوليو ١٩٨٦ تمكن علماء الهندسة الوراثية في مؤسستي ميرك Merck وشيرون Chiron بالولايات المتحدة من إنتاج أول مصل Vaccine للاستعمال الآدمي على نطاق تجاري باستخدام تكنولوجيا الهندسة الوراثية . وهو المصل المضاد لفيروس الالتهاب الكبدي الوبائي Hebatitis B والذي أطلق عليه اسم " Recombivax B " ويعتبر هذا العقار أحدث ما تم إنتاجه تجاريا في مجال العقاقير الطبية بواسطة تكنولوجيا الـ د ن أ المطعم بعد إنتاج الانسولين عام ١٩٨٢ ، وهرمون النمو الآدمي عام ١٩٨٥ ـ وبروتين المناعة ألفا إنترفيرون عام ١٩٨٥ .

ثانيا : في مجال تربية وتحسين النباتات وانتاج الغذاء :

لقد فتحت تكنولوجيا الهندسة الوراثية آفاقا جديدة في مجال تربية وتحسين نباتات المحاصيل من أجل إنتاج طعام وفير وطاقة متجددة لحل مشاكل الغذاء العالمي . وحاليا تجرى التجارب من أجل تطويع تكنيكات الـ د ن أ المطعم في الكائنات الدقيقة لتطبيقها في مجال النباتات الراقية . وبالرغم من وجود كثير من الصعوبات ، إلا أن هناك محاولات جادة لاستنباط سلالات نباتية جديدة قادرة على حل مشكلة الندرة في مستلزمات الانتاج الزراعي (مثل نقص المياه وتوفير الاسمدة ومقاومة الآفات والامراض وغيرها) وكذلك في تقليل التلوث البيئي Environmental pollution نتيجة الاسراف في استعمال المبيدات والكيماويات الزراعية . ومن المحتمل أن يتمكن العلماء من هندسة

عملية التمثيل الضوئى وراثيا من أجل الحصول على مصادر للطاقة من أشعة الشمس ، من خلال السلالات النباتية الجديدة . وإذا كانت النقاط التى سوف نعرضها فى هذا المجال تبدو غاية فى التعقيد ؛ إلا أنه من المؤكد أنها سوف تجد حلولا علمية ولكن بخطى بطيئة تدريجية. ويمكن تلخيص تكنيكات الهندسة الوراثية فى الكائنات النباتية فيما يلى :

١- استخدام المزارع الخلوية النباتية Cell cultures
٢- استخدام تباين الكلونات الجسدية Somaclonal Variation
٣- الانتخاب المباشر على مستوى الخلية للطوافر من المزارع الخلوية .
٤- اندماج البروتوبلاستات Protoplast fusion
٥- إيلاج جينات جديدة فى النباتات بواسطة ناقلات متخصصة .

وفيما يلى موجز عن الأهداف التى يحاول العلماء الوصول اليها عن طريق استخدام الهندسة الوراثية فى تربية سلالات نباتية جديدة :

١) تحويل النجيليات (كالأرز والقمح والشعير .... إلخ) إلى نباتات ذاتية التثبيت للنيتروجين الجوى عن طريق نقل الجينات المسئولة عن تكوين العقد الجذرية من البقوليات .

٢) تربية سلالات نباتية مقاومة للمسببات المرضية كالفيروسات والبكتريات وكذلك للحشرات والآفات والحشائش .

٣) تحسين القيمة الغذائية للبروتينات المخزنة فى بذور البقوليات والنجيليات عن طريق تحريك جينات حيوانية مسئولة عن تخليق

بروتينات حيوانية معينة ٠

٤) إنتاج سلالات نباتية عقيمة الذكر لانتاج بذور هجينة والاستفادة من ظاهرة قوة الهجين على أوسع نطاق ٠

٥) تحسين كفاءة عملية التمثيل الضوئى للاستفادة القصوى من الطاقة الشمسية فى زيادة إنتاجية نباتات المحاصيل الاقتصادية ٠

ثالثا : فى مجال الكائنات الحيوانية :

يهتم علماء وراثة الحيوان فى الوقت الحاضر بمحاولة استخدام تكنولوجيا الهندسة الوراثية فى تحسين نوعية الكائنات الحيوانية وراثيا ٠ ويمكن تلخيص تكنيكات الهندسة الوراثية فى الخلايا الحيوانية وتطبيقاتها فيما يلى :

١ـ استخدام تكنيك تهجين خلايا الحيوانات الثديية

Hybridization of Mammalian Cells.

ويستخدم هذا التكنيك فى عزل الطوافر من مزارع الخلايا الراسخة لتشخيص العيوب الوراثية على مستوى الخلية ، كما يستخدم فى رسم خرائط الجينات الآدمية ٠ والتطبيق العملى لذلك ينحصر فى أنه وسيلة سريعة لمعرفة تفاصيل الخريطة الجينية الآدمية وهذا مُهِم من الناحية العلمية والطبية ٠ ولقد أمكن حتى الآن تحديد أكثر من ٢٠ جينا على الكروموسوم رقم ١ وأكثر من ١٠٠ جين على كروموسوم الجنس X ٠

كما يستخدم الاندماج الخلوى فى الثدييات فى إنتاج الأجسام الضادة النقية Pure antibodies وذلك عن طريق تكوين الهيبريدومات Hybridoma وانتاج الاجسام الضادة وحيدة الكلون Monoclonal antibodies وفيما يلى عرض مبسط لبعض استخدامات هذه الاجسام الضادة :

أ) الأجسام الضادة وحيدة الكلون ضد السرطانات المرتبطة بانتيجينات معينة .

ب) الأجسام الضادة وحيدة الكلون ضد الفيروسات وخاصة فيروس رابى .

حـ) الاجسام الضادة لتشخيص عدوى الأمراض الوبائية فى الانسان .

٢ ـ استخدام تكنيك إلتقاط الد ن أ الغريب فى خلايا الثدييات

Uptake of Foreign DNA into Mammalian Cells.

ويشمل ذلك :

- إدخال كروموسومات غريبة كاملة فى الخلية الحيوانية .
- إدخال الد ن أ الخاص بجينات محددة فى الخلية الحيوانية .

وقد تستخدم هذه الطرق فى علاج السرطان .

٣ ـ استزراع الد ن أ فى خلايا الثدييات

Gene Cloning in Mammalian Cells.

ويتم ذلك عن طريق إدخال بلازميدات مهندسة وراثيا أو عن طريق مُوجِّه vector فيروس متخصص .

٤ ـ الحقن الدقيق المباشر للد ن أ فى خلايا الكائنات الحيوانية كوسيلة

للعلاج الجينى DNA-micro-injection ،
ويشمل ذلك :

(أ) استبدال خلايا نخاع العظم وحقنها بالد ن أ المرغوب ثم إعادتها مرة أخرى إلى عظام الحيوانات ٠

(ب) دمج الخلايا المزروعة المعالجة وراثيا فى الأجنة ٠

(حـ) إيلاج الد ن أ فى الأجنة بواسطة الفيروسات ٠

(د) إيلاج الد ن أ فى الأجنة بواسطة الحقن الدقيق المباشر ٠

الاحتمالات المستقبلية للعلاج الجينى فى الانسان :

إن معرفة تكنيكات إيلاج الجينات فى الكائنات الحيوانية وضمنها الانسان تتقدم بسرعة هائلة ٠ فهل يمثل ذلك أملا لعلاج كثير من الأمراض الوراثية فى الانسان فى المستقبل القريب ؟

هناك بعض الصعوبات الفنية التى يجب التغلب عليها قبل الاقدام على استخدام وسيلة العلاج هذه ، وتشمل هذه الصعوبات :

١ ـ مشكلة إدخال الجين الصحيح فى عدد كاف من خلايا الجسم لتحسين حالة المريض ٠

٢ ـ مشكلة إدخال الجين الصحيح فى الموقع المناسب من الكروموسوم ليقوم بوظيفته والتعبير عن نفسه بنفس مستوى تعبير الجين الطبيعى ٠

٣ ـ مشكلة إيجاد الناقل Vector المناسب ـ أو أى وسيلة نقل أخرى ـ لادخال الجين دون أن يؤدى ذلك إلى تلف الكروموسوم .

ويمثل حلّ كل هذه المشكلات أهمية قصوى فى الوقت الحالى. ومن المحتمل أن يتغلب عليها علماء الهندسة الوراثية فى خلال العشر سنوات القادمة .

إلا أن تقبّل المجتمع لهذه النوعية من العلاج ـ من الناحية الأخلاقية والأدبية مازال موضع تساؤل . كما أن ذلك فى رأينا لا يختلف كثيرا عن اكتشاف دواء جديد لعلاج مرض ما . وكل مافى الأمر أن يتأكد الباحثون من أن استخدام العلاج الجينى (أو الجراحة الوراثية) لا يترتب عليه تعريض المرضى لأية مضاعفات غير ضرورية .

ولقد دخل العلاج الجينى حيز التنفيذ بالنسبة لأطفال الأنابيب (أو الاخصاب فى الأنبوب IVF) للتغلب على بعض حالات العقم فى النساء . ولقد وُلِدَ أول طفل أنابيب فى العالم ـ بعد نجاح هذا التكنيك ـ فى المملكة المتحدة عام ١٩٧٨ ـ وتلى ذلك كثيرا من حالات الاخصاب فى الأنبوب فى جميع أنحاء العالم . والأمل معقود على هذا التكنيك الفريد فى نوعه لعلاج كثير من الأمراض الوراثية الآدمية فى المستقبل القريب ـ عندما يكون الكائن فى الأطوار الخلوية الأولى عقب الاخصاب فى الأنبوب .

وفيما يلى سوف نقدم عرضا تفصيليا لنموذجين من التطبيقات العملية

للهندسة الوراثية و تكنولوجيا الجينات ،الأول خاص باسترزاع جين تخليـــق الهيموجلوبين الآدمى والحيوانى ،والثانى يختص باستخدامات تقنيات الهندسة الوراثية فى السيطرة على التلوث البيئى Environmental pollution .

(١) عزل واسترزاع جين الهيموجلوبيـــن :

Isolation and Cloning Hemoglobin Gene

تعتبر جينات الهيموجلوبين من الجينات ذات الأهمية الطبية للكائـــن كما أنها تمثل نموذجا جيدا للجينات التى تُستخدم كمادة خصبة للبحث الوراثى. وكما هو معروف ،فالهيموجلوبين هو أحد بروتينات الدم الأساسية والمسئـــول عن نقل الاكسجين داخل جسم الحيوان . ويمثل "مرض أنيميا الخلايا المنجليــة Sickling " أحد العيوب الطبية الهامة ،من الناحية الوراثية ،التى تتسبب عن التركيب غير الطبيعى للهيموجلوبين .ومن وجهة النظر البحثية ،تُعتَبَر جينات تخليق الهيموجلوبين ذات أهمية كمادة للبحث الوراثى ،ويرجع ذلك إلى أنّ عددا من الجينات يُشَفِّر لطُرُزٍ مختلفة من الهيموجلوبين والتى تؤدى وظائفها خلال أطوار النمو المختلفة الجنينية واليافعة (أنظر الباب ١٥) . ولقد وفرت تقنيات كَلْوَنة cloning جينات الهيموجلوبين إمكانية إجراء الكثير من التجارب الحديثة (الباب ١٥) . وفيما يلى سوف نقدم عرضا تفصيليا للعمل الرائـــد الذى تمّ لعزل واسترزاع جين هيموجلوبين الأرنب . ويمكن تكرار تجارب مماثلـــة باستعمال الجينات الآدميـــة .

أولا : طريقة الحصول على د ن أ جين الهيموجلوبين :

باستثناء القليل ، تحتوى جميع خلايا جسم أىّ أرنب على جزيئـــات د ن أ صنوية . وبناء على ذلك ،فإنّ الـ د ن أ من أى نسيج من أنسجة جســـم

الارنب يحتوى على جين الهيموجلوبين، ولذلك يمكن طحن أى نسيج للحصول على هذه الجينات. وهنا يمكن القول بأنّ عتبة الحياة قد أمكن تخطيها . وكما هو معروف فى الفيروسات ،يمكن للد ن أ أن يُحمّل بالمعلومات الوراثية دون أن يكون جزءاً من كائن حى . ومن ثم يمكن الحصول على جينات بروتين هيموجلوبين من كائن واهب حى أو ميت. وهذه الجينات يمكن تخزينها لزمن غير محدود فى حالة متجمدة . ويمكن تلخيص العمل الرائد الذى قام به علماء الوراثة والكيمياء الحيوية ـ خلال حقبة السبعينات من هذا القرن ـ على جينات هيموجلوبين الارنب فى الخطوات التالية :

١ـ تمّ تنقية الد ن أ من كبد الارنب ،حيث تمّ تجميد نسيج الكبد ووضع فى مُقلّب وطحن حتى تم تكسير الخلايا . وبذلك تحرّرت جزيئات الد ن أ الموجودة فى هذه الخلايا .

٢ـ عُومل المستخلص الناتج بإضافة محلول تظيف مع أحد إنزيمات البروتييز التى تُحلّل البروتينات ،وذلك لإزالة جزيئات البروتين التى قد تكون ملتصقة بالد ن أ، كما أنّ هذه المعاملة تُثبّط إنزيمات النيوكلييز الموجودة فى المستخلص ، والتى قد تبدأ فى تقطيع وهضم الـ د ن أ .

٣ـ تمّ تحضين incubation المحلول على درجة حرارة ٣٧°م لعدة ساعات مع المعاملة بالفينول لاستبعاد البروتينات التى تكون قد هربت من التحلل الانزيمى .

٤ـ بعد ذلك تم تعريض المحلول المحتوى على الد ن أ إلى عملية طرد مركزى فوقى فى محلول متدرج الكثافة density gradient من كلوريد السيزيوم (CsCl) وزيت معدنى ،وذلك لتنقية الد ن أ . ولقد وُجد شريط واحد فى أنبوب الطرد المركزى تم سحبه بواسطة محقن syringe ووضع فى أنبوب اختبار.

ويلاحظ أنّ هذا الد ن أ المُنقّى يحتوى على العديد من النسخ الخاصة

بالكثير من الجينات الأخـــر .

ثانيا : كلونة (استزراع) جينات الهيموجلوبين فى د ن أ الفاج لامبدا :

Cloning Hemoglobin Genes into Phage Lambda DNA

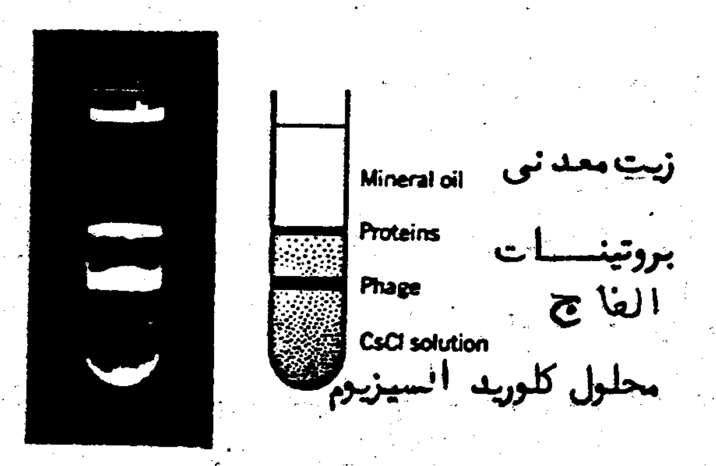
لكى تفصل جينات الهيموجلوبين من بقية الجينات الأُخر الموجودة فـى الـ د ن أ المنقى (كما فى الخطوة السابقة) ، يجب أن يتم تطعيمها فى د ن أ البكتريوفاج لامبدا ، وقد تم ذلك طبقا للخطوات التاليـة .

(١) تُنَقّى جسيمات البكتريوفاج لامبدا (λ) كما هو موضح فى الشكـل (١٦ـ١) ، ثم يستخلص الـ د ن أ الفاجى بالطرد المركزى الفوقى (حوالـى ٦٠ ألف لفة / ق) من الجسيمات الفاجيـة .

(٢) يتم إزالة منطقة الحشو stuffer من د ن أ الفاج لامبدا ، ذلـك لايجاد أماكن يطعم فيها د ن أ الأرنب داخل الجسيم الفيروسى (أنظـر مكتبات الـ د ن أ ـ الباب ١٤) . وقد تم ذلك بتقطيع د ن أ الفاج لامبـدا لمقاطع عديدة باستخدام إنزيم قطع بينى مُحَدِّد . وفى هذه الحالة يُحْتَفَـظ بمقطعى د ن أ الفاج اللازمين لاحداث العدوى ويتم لصقهما معا بإنزيم الليجيز وتستبعد فقط مقاطع الحشو غير الضروريـة .

(٣) يُجْرى تقطيع لـ د ن أ الأرنب المنقى إلى مقاطع كبيرة بإنزيمات القطـع المحـدِّدَة .

(٤) تُخْلَط معاً شظايا د ن أ الأرنب ود ن أ الفاج لامبدا ، ثم يضاف إليهـا إنزيم الليجيز لاتمام اللحام ، ثم تُغَلّف الشظايا الملتحمة مع بعضها ببروتينـات الفاج . وبهذه الطريقة يكون قد تم صَرّ جزيئات الـ د ن أ المطعمة بإحكام داخل الجسيمات الفاجيـة .



شكل (١٦ـ١) : تنقية جسمات الفاج بواسطة الطرد المركزى : يوضع مستخلص بكتيرى متحلل فى أنبوب من البلاستك، ثم يخلط مع محلول كلوريد سيزيوم ، ويعرض للطرد المركزى على سرعة ٢٥٠٠٠ لفة / ق لمدة يوم واحد . أثناء الطرد المركزى ، تكوّن جسيمات الفاج شريطا band كما هو موضح فى الصورة (والرسم التخطيطى) ، يتكون الشريط مافوق الفاج من البروتينات البكتيرية ومادة جدار الخلية ، يوجد فوق هذا الشريط طبقة من الزيت المعدنى لتمنع كسر الانبوب أثناء الطرد المركزى .

(٥) بعد ذلك يتم نقل الجسيمات الفاجية المطعمة و المخلقة فى الأنبـــوب إلى خلايا بكتيرية (إ٠كولاى) ،حيث تحدث العدوى نتيجة لحقن الـــد نأ المَصْرُور بداخلهاـ وفى أغلب الاحوال يكون الد نأ المَصْرُور محتويا على مقطع من د نأ الارنــــب٠

(٦) تفرد خلايا إ٠كولاى المصابة بالجسيمات الفاجية المطعّمة بـد نأ الارنب على أسطح من الآجار فى أطباق بترى٠ وتسمح هذه الخطوة للجسيمـــات الفاجية المطعمة بالانفصال عن بعضها ،حيث تتكوّن بقع فاجية على مُـــرُوج البكتريـــات lawns بعد تكاثر كل فاج (أنظر الشكل ١٤ــ١٢)٠

ويلاحظ أن كل بقعة plaque تنشأ من جُسَيم فاجى مختلف ،وتتكوّن كل واحدة من عدة ملايين من الجسيمات الفاجية الصنوية (identical)٠

وعندما أجريت هذه العملية وُجد أنّ عدداً قليلا منها هو الذى احتوى على جين الهيموجلوبين ،وتَطَلّب ذلك تصميم تكنيكا فريداً للبحث عن هذه البقع الفاجية النادرة ،كما يتضح من التجربة المسبرية الموضحة فى الجزء التالـى٠

ثالثا : تصميم مِسْبَر نشط إشعاعيا للبحث عن جين الهيموجلوبين المستزرع فى الفاج لامبـــدا :

للتعرّف على البقع الفاجية التى تحتوى على جين الهيموجلوبين ، يتطلب الأمر تصميم مسبر د نأ (DNA probe) لتحديد أيٍّ منـــها يكون محتويا علـى جسيمات فاجية مطعمة بالد نأ الخاص بهذا الجين ٠ ولقد تم عمل ذلـــك باستخدام مِسْبَر مشع من الحمض النووى (أنظر الباب ١٤ ــ مسابر الد نأ) اعتماداً على أُسس تزاوج القواعد التكاملى ٠ ولقد واجه تصميم المسبر مشكلة للحصــول على حمض نووى (رنأ أو رد نأ) يحتوى على تتابعات قواعد خاصة بجيـــن

هيموجلوبين . ولما كانت الخلايا يمكنها تخليق م ٠رن أ mRNA الهيموجلوبين بمنتهى الاتقان من الجينات ،فقد كان الاختيار الامثل والمنطقى الاول هو عزل وتنقية م ٠رن أ الهيموجلوبين . وعلى الرغم من ذلك ،ففى معظم حالات الاستزراع الجينى ،يكون من الصعب عزل م ٠رن أ يُمَثّل المعلومات الوراثية لمجرد جين واحد فقط من بين جزيئات الـ م ٠رن أ العديدة الممثلة لآلاف الجينات الأُخَر . وعموما ،تقوم الخلايا ببناء طُرُز عديدة من الـ م ٠رن أ فى وقت مُتَزامِن ، كما أنّ جزيئات الـ م ٠رن أ غالبا ماتكون متماثلة جدا من الناحية الكيميائية والفيزيائية مما يُصَعِّب كثيرا من فصلها عن بعضها . ولقد وُجِد أنّ م ٠رن أ الهيموجلوبين يُمَثِّل حالة خاصة ،وذلك لانّ خلايا الدم الحُمْر red blood cells تُنتج فى الاساس الهيموجلوبين ، ولذلك فإنّ معظم الـ م ٠رن أ المُخَلّق فى هذه الخلايا يكون خاصا بالهيموجلوبين . وترتب على ذلك ثبوت أن خلايا الدم الحُمْر تُمَثِّل مصدرا جيدا للحصول على م ٠رن أ mRNA الهيموجلوبين فى حالة شبه نقية تقريبا .

فصل م ٠رن أ الهيموجلوبين من خلايا الدم الحُمْر :

١ـ تسوءخذ عينة من دم الارنب ،ثم تركز خلايا الدم الحمر بواسطة الطرد المركزى ،حيث يتكون راسب pellet فى قاع أنبوب الاختبار .

٢ـ يُعَاد تعليق راسب خلايا الدم الحمر فى حجم صغير من الماء وبعض الامـلاح .

٣ـ تُهتَك أغشية الخلايا بإضافة بعض المذيبات ،حتى تَتَحَرَّر جزيئات الـم ٠رن أ منها .

٤ـ يعامل المحلول بالفينول للمساعدة فى استبعاد البروتينات .

٥ـ يضاف للمحلول قليل من كحول الايثيل وبذلك يتكوّن راسب أبيض من الـ رن أ .

٦ ـ يفصل الـ رنأ من المكونات الخلوية الاخر بواسطة الطرد المركزى ،وبهـــذا يصبح الـ رنأ فى حالة نقية ، لكن تحتوى العينة على رنأ ريبوسومى (rRNA) و رنأ ناقل (tRNA) بالإضافة إلى م·رنأ الهيموجلوبيـــن ٠

٧ ـ أمكن تَنقِية م·رنأ الهيموجلوبين باستغلال خاصية فريدة لعدة طُرز مـــن الـم·رنأ ،وُجِدَت فى الكائنات ميزات النوى ٠ وهذه الخاصية الفريدة تَتَمَثّـــل فى أنّ هذه الطرز من الـم·رنأ تحمل عدة مئات من القاعدة A متصلـــــة بأحد أطراف كل جزئ ٠ وقد استُعْمِل عمود من الزجاج تم مِلْؤه بـ د ن أ مفـــرد الخيط (ssDNA) مكوّن فقط من قواعد الثيميـــن (T's) ملتصقة بإحكام علـــى شريحة من السليولوز ٠ وعند تمرير مخلوط الـم·رنأ على السليولوز ،تُكَوِّن المقاطـع المكونة فقط من قواعد الادنين (A's) ،والموجودة فى طرف م·رنأ mRNA الهيموجلوبين ،أزواجا من القواعد المتكاملة مع تتابعات الثيمين T's المثبتـة على السليولوز ٠ وَتكُون أزواج القواعد المتكاملة المتكونة على درجة عالية مـــن القوة بحيث تمنع جزيئات م·رنأ الهيموجلوبين من الانتشار داخل العمـــــود الزجاجى ٠ أما جزيئات الانواع الاُخَر من الـ رنأ فتنتشر داخل العمود الزجاجى مرة أخرى ،حيث يمكن جمعها واستبعادهـــا ٠

٨ ـ يتم جمع جزيئات م·رنأ الهيموجلوبيـــن من العمود الزجاجى عن طريـــق فك روابط الهيدروجين بين أزواج القواعد (T = A) بواسطة التسخيـــــن الهادئ ٠ وبعد هذه العملية يكون م·رنأ الهيموجلوبين فى حالة نقية وجاهزا للاستعمال فى تحديد (جس) بقعة الفاج المحتوية على جين الهيموجلوبيـــن ٠

عملية جس probing جين الهيموجلوبيـــن :

لاتمام عملية تحديد تواجد جين الهيموجلوبين المسترزع ،يتطلب الامـــر تبديل التتابعات النوتيدية فى م·رنأ الهيموجلوبين المنقى ـ فى الجـــزء

السابق — إلى صورة عالية النشاط الإشعاعى ،ويمكن إجراء ذلك كما فى الخطوات التالية :

(١) يُخلط م ٠رن أ الهيموجلوبين المُنَقَّى مع نوتيدات حُرَّة موسومة إشعاعيا ، ثم يضاف إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase.

(٢) يقوم إنزيم النَّسخ العكسى بتخليق نُسْخَة د ن أ من النوتيدات الحرة الموسومة إشعاعيا ،مستعملا فى ذلك م ٠رن أ الهيموجلوبين كقالب template ويسمى الـد ن أ الناتج بالـ cDNA .

وفى العديد من تجارب الاستزراع الجينى ،نجد أنَّ الـد ن أ التكاملى (cDNA) والموسوم إشعاعيا يكون مناسبا جدا لتحديد البقع الفاجية المحتوية على جينات مستزرعة .

فى الدراسات الأولية لاستزراع جينات الهيموجلوبين كان من الضرورى فحص مئات الآلاف من بُقَع الفاج ، وترتب على ذلك الاحتياج إلى كميات هائلة من هذا الـد ن أ (cDNA) ،لذلك فقد تقرّر منذ البداية تخليق د ن أ تكاملى ثم تبديله إلى د ن أ مزدوج الخيط (dsDNA) باستعمال إنزيم بلمرة الـ د ن أ ، ثم بعد ذلك تم استزراعه فى بلازميد للحصول على نُسَخ عديدة منه ووسْمِها إشعاعيا . لذلك فقد طُعِّمت نُسَخ الـد ن أ مزدوج الخَيط المستنسخة من م ٠رن أ الهيموجلوبين فى البلازميدات التى تم ادخالها فى خلايا بكتريات إ٠كولاى .

وتلى ذلك تنمية خلايا إ ٠كولاى المُهَنْدَسَة وراثيا فى مستنبتات تم اختبارها لوجود التتابعات النوتيدية لجينات الهيموجلوبين باستخدام كميات صغيرة من م ٠رن أ الهيمنوجلوبين المشع . وفيما يلى عرض مبسط لاستزراع جين الهيموجلوبين من خلال تطعيمه فى بلازميد .

إيلاج نُسَخ د نأ لـ م •رنأ الهيموجلوبين فى بلازميد :

Inserting DNA copies of hemoglobin mRNA into plasmid DNA

لإيلاج نُسَخ د نأ مُخَلَّقة من قالب من م •رنأ الهيموجلوبين فى بلازميد تُتَّبع الخطوات التالية : (انظر الشكل ١٦ـ٢) :

(١) يُقَطَّع د نأ البلازميدات مرة واحدة بواسطة إنزيم إند ونيوكليز مُحَدَّد لتحويل الد نأ الدائرى إلى جزئ طولى linear (الشكل ١٦ـ٢أ) .

(٢) تُشَيَّد أذيال طويلة مفردة الخيط s stranded بمعاملة كل د نأ بانزيم يسمى الإكسونيوكلييز exonuclease (الشكل ١٦ـ٢ب) .

(٣) يستعمل إنزيم آخر (إنزيم النقل الطرفى t.transferase) لإضافة حوالى ١٠٠ نوتيدة (T's) ثيمين فى أذيال tails نُسَخ الد نأ ،وحوالى ١٠٠ نوتيدة (A's) أدنين لنهايات د نأ البلازميد (الشكل ١٦ـ ٢جـ) .

(٤) عند ما خلط طرازى الد نأ معا ، تكونت أزواج قواعد من كلٍّ من الأدنين A's والثيمين T's،وترتب على ذلك وَصْل نسخ الد نأ فى البلازميد (الشكل ١٦ـ٢د) .

(٥) بعد ذلك أضيفت جزيئات الد نأ الدائرية الناتجة إلى مستنبت (كلون) من خلايا إ •كولاى ،حيث دخلت جزيئات الد نأ المطعمة cDNA plasmids) بعض الخلايا البكتيرية .

(٦) وجد أنَّ البلازميد يحتوى على جين يُضْفِى المقاومة للمضاد الحيوى تتراسيكلين ،لذلك فعند ما وضعت خلايا إ •كولاى على أطباق من الآجار بها المضاد الحيوى تتراسيكلين نمت فقط الخلايا البكتيرية المحتوية على البلازميد المطعم مكونة مستعمرات .

(٧) تم بعد ذلك اختبار هذه المستنبتات لوجود د نأ الهيموجلوبين بطريقة تهجين الأحماض النووية التى وصفت فى الباب الرابع عشر.

دليل الشكل (١٦ـ٢) : وصل الـ د ن أ التكاملى للهيموجلوبين لـ د ن أ البلازميد .

(أ) تخلق أذيال مفردة الخيط بطريقة إنزيمية على د ن أ البلازميد وعلى نسخة من د ن أ الهيموجلوبين وذلك بمعاملة جزيئات الـ د ن أ بإنزيم يسمى لامبدا إكسونيوكلييز .

(جـ) يستخدم إنزيم النقل الطرفى terminal transferase لإضافة نوتيدات تكاملية للأذيال .

(د) عندما يخلط د ن أ البلازميد ود ن أ الهيموجلوبين معا ، فإن الأذيال التكاملية تكون أزواجا من القواعد منتجة بلازميد مطعم دائرى .

(أ) Circular plasmid DNA + Restriction endonuclease → Linear plasmid

إنزيم إندونيوكلييز — بلازميد طولى

(ب) b

Linear plasmid + Lambda exonuclease → Linear plasmid with long single-stranded tails

لامبدا إكسونيوكلييز — بلازميد طولى بأذيال مفردة

Complementary DNA + Lambda exonuclease → Complementary DNA with long single-stranded tails

د ن أ تكاملى — د ن أ تكاملى بأذيال مفردة

(جـ) c

+ Terminal transferase + A → ...AAA ——— AAA... Plasmid DNA with poly A tails

إنزيم نقل طرفى — د ن أ بلازميدى بأذيال بولى A

+ Terminal transferase + T → ...TTT ——— TTT... Complementary DNA with poly T tails

د ن أ بلازميدى بأذيال بولى A

(د) d

Recombinant DNA

د ن أ مطعم

ولقد وجد أن حوالى ٨٠٪ من المستعمرات كانت محتوية على د ن أ DNA الهيموجلوبين ،وبذلك أصبحت هذه المستنبتات مصدراً لكميات كبيرة من الـ د ن أ اللازم للبحث عن فاجـات محتوية على د ن أ الهيموجلوبين .

ولقد تم وَسْم البلازميدات المطعمة بالـ د ن أ التكاملى (cDNA) إشعاعيا باستعمال إنزيم يمكنه إضافة ذرة فوسفور مشعة إلى نهايات الـ د ن أ ،كما أنّ هذه البلازميدات قد استعملت لاختبار ٧٥٠٠٠٠ بقعة فاجية لاستكشاف البقع المحتوية على جينات الهيموجلوبين،وشملت عملية الاختبار استعمال طريقة تهجين الأحماض النووية . ولقد تم عزل أربع بقع فاجية حاوية لجينات الهيموجلوبين من العدد السابق الإشارة إليه .

(٢) استخدام تقنيات الهندسة الوراثية في السيطرة على التلوث البيئى :

Application of Genetic Engineering Techniques to Control Environmental Pollution.

مقدمة :

يمثل التلوث البيئى فى وقتنا الحاضر ـ واحدة من أهم المشكلات التى تواجه الانسان وغيره من الكائنات الحية التى تسكن الكرة الأرضية . ونظراً للتزايد المستمر فى استعمال الكيماويات الاصطناعية فى الزراعة وغيرها من مستلزمات الانسان فى شتى مناحى الحياة الحديثة له ،فقد تلازمت رفاهية الجنس البشرى مع التزايد فى التلوث البيئى له ،بحيث أصبح ذلك من أخطر المشاكل التى تهدد الصحة العامة له . وفى خلال السنين القليلة الماضية ، لفت العلماء نظر الحكومات والهيئات الدولية إلى خطورة المشاكل الناتجة عن كثرة استعمال الملوثات البيئية . وتعتبر مبيدات الآفات pesticides والمخصبات الكيماوية وغيرها من المواد الكيميائية المستعملة فى الزراعة الحديثة

وكذلك التزايد المستمر فى استعمالات زيت البترول والفحم ومشتقاتهما من بين الملوثات البيئية الرئيسية للتربة والهواء والماء • كما ظهرت مشاكل عديدة لتلوث البيئة نتيجة المخلفات الصناعية السامة الناتجة من المصانع • لذلك تعتبر الكيماويات الاصطناعية سلاحا ذا حدين ،فمن ناحية هى مفيدة للانسان ، ومن ناحية أخرى قد تكون ملوثة لبيئته •

ويمكن تقسيم مشاكل التلوث البيئى إلى قسمين رئيسيين :

(١) مشاكل موجودة فى البيئة الحيوية biosphere ،منذ زمن بعيد ، ومن أمثلتها مركبات الهيدروكاربون الداخلة فى الصناعات البترولية ،وكذلك المخلفات الآدمية والحيوانية •

(٢) مشاكل ناتجة من التقدم الحضارى الصناعى للانسان ،وأهمها كثرة استخدام مبيدات الآفات•

نظرة شاملة عن دور العلوم الوراثية فى السيطرة على التلوث البيئى :

توجد وسائل تقليدية عديدة للسيطرة على التلوث البيئى والحد منه ، إلاّ أنّ التقنيات الوراثية تعتبر أهمها وأكفأها • وفى خلال السنين القليلة الماضية ،بدأ تطبيق بعض تقنيات الهندسة الوراثية - كوسائل فعّالة وسريعة - لمقاومة التلوث البيئى • وفى هذا المجال يبدو أنّ الكائنات الدقيقة المُهَنْدَسة وراثيا تلعب دوراً هاماً فى هذا الشأن ،حيث تشير بعض التقارير العلمية إلى تحقيق بعض النجاح فى هذا الاتجاه•

ومن ناحية أخرى ،يبذل علماء الهندسة الوراثية جُهوداً جبارة لاستنباط سلالات مُهَنْدَسة وراثيا من نباتات المحاصيل الزراعية (transgenic plants) مقاومة للكثير من الآفات ،كوسيلة بديلة لوقف أو تقليل استعمال المبيدات

الكيماوية الصناعية (كمبيدات الحشرات والحشائش والفطريات وغيرها) ،والتى تمثل أهم الملوثات البيئية الخطيرة على صحة الانسان والحيوان .

وفيما يلى عرض موجز عن دور بعض الميكروبات المُهَنْدَسة وراثيا فى السيطرة على التلوث البيئى :

أ ــ تشييد بكتريات مُهَنْدَسة وراثيا توقف فعالية وتهدم مبيدات الافات وغيرها من الملوثات الصناعية :

(١) تمكن العالم كرانز Krans (١٩٨٥) من عزل طرازين من البكتريات يمكنهما تجريد وهدم بعض مبيدات الافات . فطراز البكتريات المهندس وراثيا والمسمى Flavobacterium يستطيع إنتاج إنزيمات تُجَرِّد المبيد الحشرى "كوما فوس Coumaphos" . وهذا المبيد شائع الاستعمال فى مقاومة الافات الحشرية التى تتطفل على الماشية (livestocks) ،وهو قادر على البقاء بصورة فعّالة فى التربة لفترة طويلة . ولقد فشلت المحاولات السابقة للتخلص منه بعد استعماله . والطراز الآخر من البكتريا يسمى الـAchromobacter يمكنه تخليق إنزيمات قادرة على قتل ديدان ثاقبات جذور الأذرة وغيرها من المحاصيل ،كما يمكنه تَجْرِيد المبيدات التى يدخل فى تركيبها "ميثيل الكارباميت" مثل المبيد كاربوفيوران، (Carbofuran) . ولقد وُجِد أنّ استعمال محاليل من هذه البكتريات المُهَنْدَسة وراثياً يمكنه المساعدة بدرجة كبيرة فى إزالة التأثير السام لهذه المبيدات وتطهير البيئة منها .

(٢) من المعروف أن مركبات الفينول الثنائية عالية الكلور (PCB's) poly-chlorinated biphenyls تسبب تشوهات خِلْقِية فى الأجنة الآدمية وأجنة الماشية . وتستعمل هذه المركبات كمبيدات آفات . ولقد تمكن علماء الهندسة الوراثية اليابانيون (١٩٨٦) من تحريك جينات مُسْتَزرعة فى بلازميدات

إلى سلالة من بكتريا السيد وموناس Pseudomonas ،بحيث أصبحت هذه السلالة تُخلِّق مجموعة من الانزيمات قادرة على تحليل هذه المبيدات الخطيرة . ولقد اعتمد التكنيك المستعمل على عزل مجموعة من أربعة جينات مختلفة من بكتريات الـ Pseudomonas قادرة على هدم هذه الملوثات الخطيرة . ولقد وجد أنّ هذه الجينات الأربعة شديدة الترابط فى الكروموسوم البكتيرى ،مما يُوحِي بكونها تعمل تحت نظام متناسق . ولقد أمكن استزراع ثلاثة من هذه الجينات فى بكتريات إ.كولاى (يوشيكاوا ـ ١٩٨٦) .

بـ تشييد بكتريات مُهَنْدَسَة وراثيا للتخلص من ملوثات البترول :

لم تقتصر التطبيقات العملية للهندسة الوراثية فى مجال التخلص من الملوثات البيئية على وقف تأثير المبيدات بعد استعمالها ،بل تعدتها الى مجال تنظيف البيئة من ملوثات البتروكيماويات وبقع الزيت المتسرب من الناقلات فى مياة البحار والمحيطات . فقد تمكن العالم شاكرابارتى Chakrabarty (١٩٨٢) من تخليق سلالتين مُهَنْدَسَتَين وراثيا من بكتريات سيد وموناس Pseudomonas كل منها قادر على هدم أربع فئات من الكيماويات السامة الموجودة فى بقع زيت البترول المنسكب. ولقد وجد أنّ اثنين من هذه الكيماويات البترولية السامة ،هما بنتاكلوروفينول Penta-chlorophenol وهيكساكلوروسيكلوبنتاديين Hexachloro-phenol ، لهما قدرة على البقاء طويلا مسببين مشاكل بيئية خطيرة . ولقد أمكن بالانتخاب عزل سلالة بكتيرية وأخرى فطرية يمكنهما تحليل وهدم المركب الأول . والمركب السام الثالث فى مخلفات البترول وهو "الميثيل باراثيون (methyl parathion) يتحلل فى غضون أيام قلائل من استخدامة كمبيد .

ولقد بُذِل جهد كبير فى عزل بكتريات تهدم مركبات البتروكيماويات التالية :

- (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid(2,4-D)
- (2,4,5-trichlorophenoxy) acetic acid(2,4,5-T)

ولقد وجد أن بكتريات من النوع *Alcaligenes paradoxus* يمكنها أن تُحلّل بسرعة فائقة مادة ال 2,4-D ،كما وجد أن المعلومات الوراثية المسئولة عن هذا النشاط الهدمى محملة ضمن جينات بلازميد في هذه البكتريا ،إلاّ أنّ البحاثة لم يتمكنوا من العثور على سلالات بكتيرية تستطيع هدم مركب ال (2,4,5-T)أو المكوِّن شديد السمية الموجود معه والمسمى

2,3,7,8-tetrachloro-dibenzopara-dioxin (TCDD).

ولقد استطاع شاكرابارتى أن يقدم دليلا قاطعا على أنّ البكتريم الذى خَلَقَه بأساليب الهندسة الوراثية ،يمكنه أن يُحَلِّل المخاليط البترولية المعقدة لزيت البترول الخام . واقترح شاكرابارتى طريقة سهلة لاستعمال ميكروبه في تنظيف بقع البترول ،حيث تُنَمّى البكتريات فى المختبر ثم تخلط مع كميات من "القش "وتجفف،ثم تحفظ لحين استعمالها . وعند الاستعمال يمكن إلقاء هذه البكتريات المُغَلّفة بالقش من السفن أو الطائرات على بقع الزيت فى مياه البحار والمحيطات . وفى هذه الحالة يقوم القش بامتصاص الزيت فى حين يقوم الميكروب بتحليله . وبعد ذلك يمكن إزالة القش بأسلوب ميكانيكى . ولقد كان تخليق أحد ميكروبات شاكرابارتى هو الذى دفع المحكمة العليا فى الولايات المتحدة للحكم بضرورة تسجيل المخلوقات الجديدة الناتجة من تقنيات الهندسة الوراثية ببراءات اختراع . ويتميز مخلوق شاكرابارتى الجديد بقدرته على القيام بعدة أنشطة تحليلية فى آن ولحد ،بينما فى الميكروبات الأخر ، تخلط عدة أنواع من البكتريات ،كل واحد منها يقوم بنشاط هدمى مفرد .

جـ ــ تشييد فطريات مهندسة وراثيا للتخلص من التلوث البيئى :

لقد تمكن علماء الهندسة الوراثية من تحريك جينات إلى بعض الفطريات يحيث تتمكن هذه المخلوقات من إزالة المعادن الثقيلة من المخلفات الصناعية ، كما أمكن تشييد فطر النوكارديا Nocardia وهو يتبع عائلة Actinomycetes ،ويقوم هذا الفطر بتحليل مخلفات المطاط من مصانع الدراجات والسيارات .

د ــ مبيدات الآفات البكتيرية كبديل للمبيدات الكيماوية (المبيدات البيولوجية):

Biological Pesticides:

وُجِّهَت تقنيات الهندسة الوراثية من مجال السيطرة على التلوث البيئى الناتج من استخدام المبيدات الكيماوية إلى استخدام المبيدات البيولوجية كبديل لها . وتنحصر الميزة الأساسية فى استخدام الميكروبات المبيدة microbial pesticides للآفات فى كونها لاتستمر لفترة زمنية طويلة على الحيوانات أو النباتات المعاملة بها . ومن وجهة النظر الاقتصادية وُجِدَ أن البكتريات:

B. popilliae, B. sphaericus, and B. thuringiensis

وجميعها يتبع الجنس باسيلوس Bacillus ،هى أكثر البكتريات أهمية كمبيدات ميكروبية .

وسوف نتناول هنا بكتريات النوع Bacillus thuringiensis بشئ من التفصيل لأهميتها من الناحية الزراعية : فقد تمكن هيلد ومعاونوه Held et al. (١٩٨٢) من كلونة (استزراع) وتحديد موقع جين تخليق البروتوكسين (القاتل ليرقات رتبة حشرات حرشفية الاجنحة Lipidoptera

والتى تتبعها حشرات دودة ورق القطن وديدان اللوز)، الموجود فـــى سلالة البكتريا Bacillus thuringiensis,sub.sp.Kurstaki • فمـــن المعروف أن هذه البكتريا تنتج مركبا بروتينيا على شكل بلورات crystals وهو سام ليرقات رتبة حرشفية الأجنحة • ويحتوى هذا الكائن على عدد مـــن البلازميدات مختلفة الأحجام • ولقد وُجِدَ أنّ وجود واحد أو أكثر من هـــذه البلازميدات يكون مرتبطا بانتاج البروتين السام والذى يسمى "البروتوكسيـــن protoxin "، ولقد أمكن الحصول على عدد من شظايا الدنأ من هذه السلالة البكتيرية باستخدام انزيم القطع EcoRI ،حيث تم استزراعهـــا فى الناقل المسمى شارون Charon 4A • وأجرى البحث عن الفاجات المطعمة بطرق مناعية immunologically لانتاج البروتين السام • ولقد وجـــد أن الخلايا التى تصاب بأحد الفاجات C4K6c ــ تعطى مولدة (أنتيجينا) لها نفس حجم البروتوكسين وكانت سامة ليرقات الحشرة المسماة Manduca sexta ولقد تم عزل شظية دنأ طولها ٦ر٤ ك•ز•ق (Kbp) بواسطة إنزيم EcoRI من البلازميد C4K6c ثم أُعيد استزراعهـــا فى البلازميد الاصطناعى pBR328 ،ثم فى اتجاهين عكسيين فـــى البلازميد PHV33 • وقد بينت النتائج أنّ كلاً من خلايا إ•كولاى وخلايـــا باسيلوس سبتيلس Bacillus subtilis المحتوية على هذه البلازميدات المطعمة كان فى مقدرتها انتاج أنتيجين تداخل مع الجسم المضاد المُوَجَّه ضـــد البروتوكسين • ولاجراء التجارب المسبرية probing لجس وجود الجيـــن المرغوب، فقد تم تنقية البلازميدات المطعمة ذوات الأحجام المختلفة من بكتريـــا بتاسيلوس ثورنجنســـس B. thuringiensis المهندسة وراثيا ،ووجـــد أنّ شظية واحدة معزولة بالانزيم المحدد EcoRI من البلازميد ذى الطول ٤٥ كيلو/زوج /قواعد (Kbp) هى التى تزاوجت مع مقطع الجين المحمل فـــى الفاج المطعم C4K6c ،كما أن شظية أخرى من كل من البلازميديـــن

PSM36, PHV33 قد أمكن كل منها التهجين مع شظايا متساوية الأطوال مستخلصة بالانزيمات EcoRI/HindIII من الدنا البلازميدى أو الكروموسومى . ولقد كانت شظية EcoRI محتوية على شظية أصغر PVUII طولها ٩ر٠ ك.ز.ق وهذه موجودة فقط فى الكروموسوم البكتيرى دون الشظايا البلازميدية . وأثبت التحليل أن الجين بروتوكسين "protoxin" محمل شقريا فى كل من الكروموسوم البكتيرى وفى البلازميد الكبير ٤٥ك.ز.ق على السواء . ولقد أمكن عزل كثير من الطوافر غير السامة والتى لا تكوّن كريستلات البروتين وكان ينقصها البلازميد ٤٥ ك.ز.ق ،وفى بعض الأحيان البلازميدات الأخر . ولقد وُجِدَ أنّ جميع الطوافر تحتوى على مقطع الجين الكروموسومى، إلاّ أنها لا تنتج أنتيجين البروتوكسين ،وهذا يثبت أن الجين الكروموسومى يكون غير فعّال فى غياب الجينات البلازميدية .

ويحاول علماء الهندسة الوراثية فى الوقت الحاضر عزل كل من الجين البلازميدى ونظيره الكروموسومى من هذه البكتريات لتحريكهما إلى خلايا نباتية ـ كخلايا نبات القطن بهدف هندسة هذا النبات وراثيا وجعله قادر على تخليق هذا البروتوكسين ذاتيا مما يُضفِى عليه المقاومة لديدان حشرات حرشفية الأجنحة ،الأمر الذى لو تحقق ،يترتب عليه وقف استخدام الكميات الهائلة من المبيدات ،وتخليص البيئة الزراعية المصرية من مصدر رئيسى للتلوث.

والأمر الذى يدعو للتفاؤل فى هذا الاتجاه ،هو نجاح علماء هندسة الوراثة فى شركة مونسانو Monsano الأمريكية فى كلونة هذا الجين (The BT gene) فى نباتات الطماطم ،وأعطى سلالات من هذا النبات قادرة على مقاومة الحشرات التى تصيبه .

بكتريات مهندسة وراثية لانتاج مبيدات بكتيرية لمقاومة البعوض:

من المعروف أنّ نوع البكتريات "باسيلوس سفيريكس B. sphaericus ينتج أحد السموم الفعّالة ضد يرقات البعوض mosquitos • ويبدو أنّ التأثير الفعّال الرئيسى لهذا التوكسين موجود فى مكونات الجدار والغشاء الخلوى للخلايا المتحوصلة لهذه البكتريات ،وهو بهذا يختلف عن طراز التوكسين الذى يتكوّن على شكل بلورات فى نوع البكتيريات ب•ثورنجنسس B. thuringien السابق الإشارة إليه •

ولقد تمكن علماء الهندسة الوراثية من عزل مقطع من الدنا طوله ٣ر٧ كيلو/زوج قواعد معزول من البكتريات ب• سفيريكس،وزرعه فى خلايا إ•كولاى حاملة للنشاط البيولوجى المضاد لنوعين من البعوض• وللحصول على أقصى فعالية للمبيد كان من الضرورى هندسة خلايا إ•كولاى وراثيا حاملة للبلازميد المطعم فى وجود مسحوق التريتون TritonX 100 (مادة مستخلصة من الحيوانات البحرية) قبل إجراء المسح البيولوجى • ولقد اتضح أنّ ناتج الجين المستزرع يتكون على الجدار الخلوى لـ إ•كولاى كما فى ب•سفيريكس •

ولقد يسّرت عملية استزراع هذا الجين فى إ•كولاى وسيلة لدراسة خصائص هذا المبيد البكتيرى• والأمل معقود لاستخدام هذه التقنية فى القضاء على يرقات البعوض كوسيلة آمنة وغير ملوثة للبيئة ،بدلا من استخدام المبيدات الكيماوية الاصطناعية وما تمثله من أضرار للصحة العامة للانسان •

(الباب السابع عشر)

أساليب الهندسة الوراثية فى الكائنات الراقية

مقدمة :

منذ بداية حقبة الخمسينات من القرن العشرين ،بدأ كثيرون من علماء الوراثة فى استخدام الكائنات بدائيات النوى (prokaryotes) (البكتريات والفيروسات) كمادة للبحث الوراثى فى تجاربهم ،لما لهذه الكائنات من ميزات فنية مفيدة كقِصَر دورات حياتها وقدرتها على انجاب أعداد كبيرة من النسل تعيش فى بيئة محدودة للغاية .

ومع استمرار النمو فى البيولوجيا الجزيئية وتكنولوجيا الدنا المطعم ، ازداد الاتجاه لاستخدام أنظمة حية تتميز بالبساطة والمرونة من الناحية الفنية . ومن المؤكد أنّ التقدم الهائل فى مجال الهندسة الوراثية لم يكن من الممكن أن يحدث مالم تكن الأنظمة الحية التجريبية البسيطة متوافرة . ويُفضّل كثير من علماء الوراثة دراسة الوراثة الجزيئية للآدميين والحيوانات والنباتات الراقية أكثر من مجرد دراسة هذا المجال للبكتريات ،ويرجع ذلك لأسباب تطبيقية وأسباب علمية نوجزها فيما يلى :

أولا : تمثل المعلومات المتوافرة من الوراثة الجزيئية للحيوانات والنباتات الراقية أهمية ذات فائدة من الناحية الزراعية . فإذا عرفنا أنّ أكثر من ٣٠ ٪ من سكان كوكب الأرض يعيشون دون المستوى الأدنى من الناحية الغذائية ، فإنّ البحث عن سُبل لزيادة إنتاج الغذاء لابد وأن يحظى باهتمام المجتمع العلمى العالمى . وفى هذا المقام يُطْرَح هذا السؤال : هل يمكن إجراء

معالجة للمواد الوراثية للحيوانات والمحاصيل الزراعية بطرق جديدة لزيادة إنتاجيتها أو مقاومتها للآفات والأمراض ، وتحسين قيمتها الغذائيـــــة ؟

ثانيا : تمثل المعرفة الجيدة للوراثة الجزيئية فى الآدميين ضرورة أساسيــــة للمساهمة فى علاج بعض الأمراض الوراثية فى الانسان (وربما الحيوان) • فكثيـــر من هذه الأمراض له أسباب وراثية ، ومحاولة علاجها تعتمد أساسا على التفهم العميـــق لأسبابهـــا •

ثالثا : إنّ واحدة من أهم المشاكل التى تتحدى عِلْم البيولوجيا الحـديث ، هى قدرة العلماء على السيطرة على تعبير الجينات أثناء النمو والتَكَشّـــف (development and differentiation) • ونظراً للاختـــلاف الجوهرى بين النُّظُم الوراثية لبدائيات النوى وتلك الخاصة بمميزات النوى ، فإنّ تعبير الجين فى الأولى يختلف اختلافات جوهرية عن تعبير الجين فى الثانيـــة • ومن ثم يتطلب الأمر دراسة تعبير الجين فى مميزات النوى بطرق مختلفة عـــن تلك المستعملة فى بدائيات النـــوى •

والسؤال الذى يطرح نفسه هو : كيف يمكن دراسة البيولوجيا الجزيئيـــة للانسان والحيوان والنبات بطرق مماثلة لما هو معروف فى البكتريات؟ ولقـــد تمت الاجابة عن هذا السؤال باستخدام المزارع الخلوية cell cultures الحيوانية والنباتية ومحاولة دراسة ومعالجة هذه الخلايا تجريبيا من الناحيـــة الوراثية • ويجدر الذكر أن علم وراثة الخلايا المستزرعة ينمو بسرعة هائلة، ولسوف يستمر ذلك فى المستقبل المنظور • ويحاول العلماء تطويع تكنيكات الوراثـــة الميكروبية لاستخدامها فى وراثة الكائنات الراقية • وبالرغم من أنه قد سبـــق عرض هذه التكنيكات فى أبواب سابقة من هذا المرجع ، الا أننا سوف نوجزها فيمـا يلـــى :

١- في البكتريات:

* التحول الوراثي Genetic transformation: د ن أ حر ينقل اصطناعيا من خلايا واهبة إلى خلايا مُسْتَقْبِلة .

* الاستنقال Transduction : د ن أ ينقل من خلايا واهبة إلى خلايا مستقبلة من خلال فيروس (بكتريوفاج) .

* التزاوج الاقتراني Conjugation : انتقال الكروموسوم البكتيري جزئيا من خلية واهبة إلى أخرى مُستقبِلة .

* كلونة الجينات Gene cloning : يستزرع مقطع د ن أ في ناقل (بلازميد أو فيروس)ثم يُدْخَل الناقل المُطَعَّم في خلية بكتيرية .

٢- في الفطريات:

* الدورة بديلة الجنس Parasexual cycle : التحام خيوط الهيفات -يتلوه اندماج نووي - ثم يلي ذلك فقد كروموسومي أثناء الانقسامات الميتوزية (الشكل ١٧-١) .

استعمال مزارع الخلايا الحيوانية والنباتية في الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية:

تمثل مزارع الخلايا (حيوانية أو نباتية)الوسيلة الأساسية لتطبيق تكنيكات الوراثة الميكروبية على الكائنات الراقية . ومن حسن الحظ أن التكنيكات الخاصة بالمزارع الخلوية للكائنات العليا قد تم اكتشافها وتطويرها منذ فترة طويلة .

وسوف نتناول فيمايلى بعض المعلومات عن مزارع الخلايا الحيوانية ،وفى جـــزء لاحق من هذا الباب سوف نتناول مزارع الخلايا النباتية وطرق معالجتها وراثيا .

مزارع الخلايا الحيوانية: Animal Cell Cultures

يوجد نوعان من مزارع الخلايا الحيوانيــــة :

(أ) المزرعة الخلوية الاوُلية: Primary cell culture

عند عزل خلايا حية من أنسجة آدمية أو حيوانات ثديية أُخَر ووضعهــــا فى بيئة نمو ،فعادة ماتدخل الخلية المزروعة فى عدة انقسامات ميتوزية قد تصـــل إلى ٢٠ جيلا قبل ما تتوقف عن النمو . ولذلك فهذا النوع من المزارع الخلوية الحيوانية له فترة حياة محدودة ،ويطلق عليها اسم المزرعة الخلوية الاوُليـــة .

(ب) المزرعة الخلوية الراسخة: Established cell culture

من وقت لآخر ،قد ينتج خط خلوى cell line من مزرعة خلويـــة أولية له فترة حياة غير محدودة ،حيث يمكن زرعة إلى مالانهاية من الاجْيـــال ، شأنه شأن أى كائن دقيق . وفى هذه الحالة يطلق على المزرعة اسم "المزرعـــة الخلوية الراسخة" أو "الخط الخلوى" ،ومن أمثلة ذلك الخط الخلوى لخلايـــا الهلا (HeLa) المعروف فى بحوث السرطـــان .

وهذا الطراز من المزارع الخلوية هو المستعمل فى تقنيات الهندســـة الوراثية فى الكائنات الحيوانية الثديية . ولايعرف سبب واضح للتَبدُّل من المزرعـة الاوُلية إلى المزرعة الراسخة ،إلاّ أنّ الاخيرة قد تشترك فى بعض الخصائص ــ فــى أطوار نموها الاوُلى ــ مع بعض الخلايا السرطانيــــة .

مقارنة بين المزارع الحيوانية الراسخة ومزارع البكتريات:

يمكن تلخيص أوجه الشبه والاختلافات العامة بين كلا نوعى المزارع الخلوية فى النقاط التالية :

١ـ تُنَمَّى مزارع البكتريات على سطح بيئة مجمدة بالآجار ،بينما تنمى مزارع الخلايا الحيوانية مُعلَّقة على سطح من الزجاج أو البلاستيك ، وتُغْسَل الأخيرة فى بيئة سائلة .

٢ـ مُعَدَّل إنقسام الخلايا الحيوانية أبطأ كثيراً (من ١٠ـ٢٠ ساعة للجيل الواحد)من معدل إنقسام الخلايا البكتيرية (من ٢٠ـ٦٠ دقيقة للجيل الواحد) .

٣ـ تكون بيئة استزراع الخلايا الحيوانية أكثر غنى من الناحية الغذائية بالمقارنة ببيئة نمو البكتريات . ويرجع السبب لضرورة وجود مصل (serum) مضاف يحتوى على عوامل نمو غير مُحَدَّدَة فى بيئة نمو الخلايا الحيوانية .

وعقب اكتشاف مزارع الخلايا الحيوانية وتطويرها ،اتجه علماء الوراثة لدراسة امكانية تبادل المواد الوراثية بين خطوط خلوية مختلفة على شكل طراز من التزاوج . وكما هوالحال فى البكتريات ،فإنَّ ذلك لايحتاج إلى اندماج جاميطى . وقد اتضح بجلاء وجود عدة طرق مختلفة تماما لتكوين تنظيمات جديدة من المادة الوراثية فى الخلايا المنماة فى المزارع الخلوية .

تقنيات الهندسة الوراثية فى الخلايا المنماة فى المزارع الخلوية :

(١) الاندماج الخلوى : Cell fusion

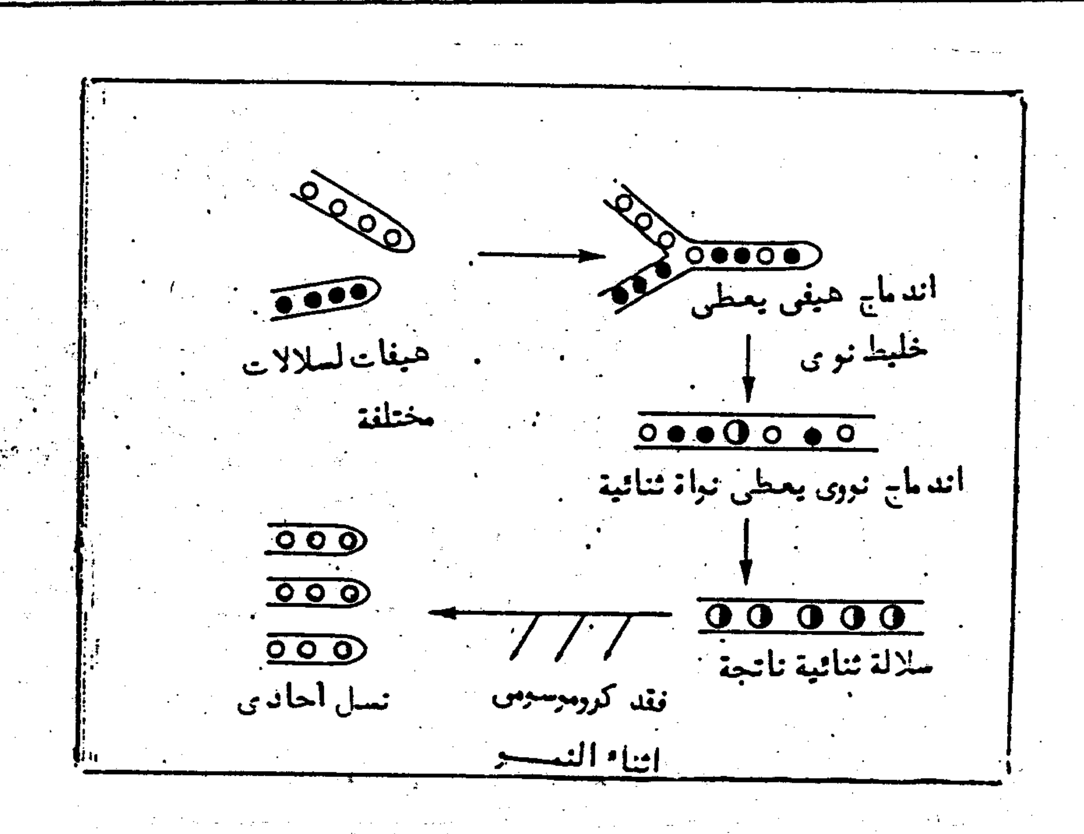
قد تندمج خلايا الثدييات المنماة فى المزارع ،ثم تدخل فى سلسلة

من الأحداث غالبا ماتشبه الدورة بديلة الجنس فى فطر الأسبرجلس (الشكل ١٧ــ١) . فعقب الاندماج الخلوى ، قد يندمج النوى معطيا ضعف العدد الكروموسومى تقريبا الذى كان موجودا فى الخلايا الأصلية . فلوكانت الخلايا التى تندمج آتية من خطوط خلوية مختلفة ، فلسوف تنتج خلية هجينة . وفى أثناء الانقسامات الميتوزية التى تَلِى الاندماج ، تُفْقَد بعض الكروموسومات ، ويترتب على ذلك تكوّن نسل من المستعمرات بأعداد كروموسومية مختلفة . وتسمح دراسة المستعمرات الناتجة فى النسل بنوع من التحليل الوراثى فى المزرعة ، والذى تتولد عنه ثروة من المعلومات عن تنظيم الجينات الآدمية فى الكروموسومات .

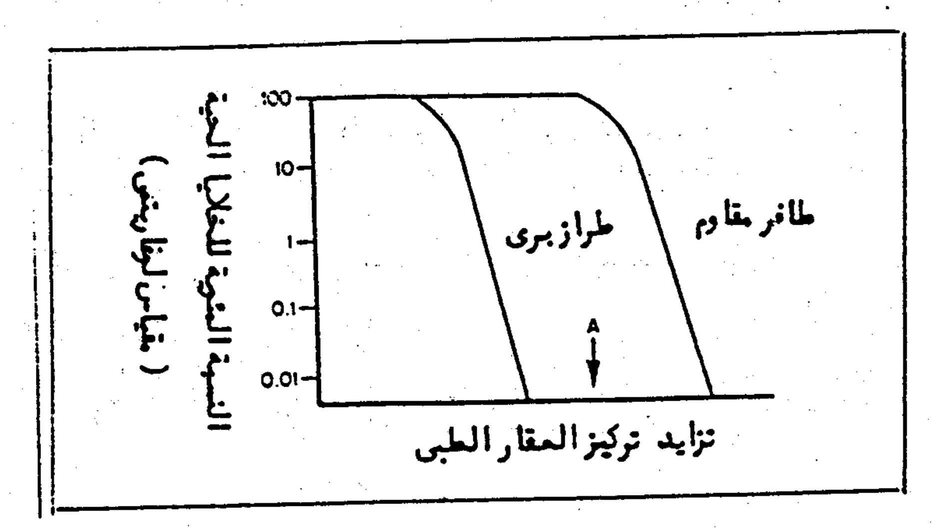
والاندماج الخلوى الذى يشتمل على طُرُزٍ معينة من خلايا مُنْتِجَة للأجسام المضادة له أهمية خاصة من الناحية الطبية . وهذه التقنية من تقنيات الهندسة الوراثية فى الكائنات الثديية تعطى خطوطا خلوية هجينة يمكنها إنتاج كميات هائلة من الأجسام المضادة على درجة عالية من النقاء .

(٢) التحول الوراثى فى الخلايا الحيوانية : Transformation in animal cells

من الممكن إيلاج insertion الدنا فى الخلايا الحيوانية المستزرعة ، إمّا فى صورة نقية أو على صورة كروموسومات كاملة . ، ومن ثم يسمح ذلك بإجراء دراسات وراثية مكافئة لعملية التحوّل فى البكتريات . وقد ثبت حاليا أنّ عملية التحول فى الخلايا الحيوانية مفيدة للغاية فى دراسة بعض المشاكل البيولوجية الأساسية ، فعلى سبيل المثال ، تستعمل هذه العملية الآن لتشخيص جينات السرطان الآدمية ، ويعتبر ذلك أهم تقدم جوهرى قدمته هندسة الجينات فى مجال بحوث السرطان ، ولسوف يستمر ذلك لسنوات عديدة قادمة .



شكل (١٧-١) : رسم تخطيطى لخطـــوات الدورة بديلة الجنس فى فطر الأسبرجلس.



شكل (١٧-٢) منحنيـات القابلية للحياة لخلايا الطراز البرى (يسار)، وخلايا طافر مقاوم (يمين) فردت تحت ظروف تركيزات متزايدة من عقار طبى، التركيز A لعقار قد يستعمل فى انتخاب طوافر مقاومـة .

(٣) كلونة (استزراع) الجينات فى الخلايا الحيوانية: Gene cloning in animal cells

يمكن أن تولج الجينات كيمائيا فى الـ د ن أ الخاص بناقلات استزراع cloning vectors (كالبلازميدات والفيروسات) والتى يمكنها التناسخ داخل الخلايا الحيوانية . ويسمح هذا التكنيك باستزراع الجينات فى الخلايا الحيوانية بطريقة مشابهة لتلك المستعملة فى استزراع الجينات البكتيرية (الباب ١٤) . ولقد فتح هذا العمل آفاقا علمية وتطبيقية واسعة فى هندسة الكائنات الحيوانية وراثيا .

وتمثل تكنيكات الهندسة الوراثية فى الكائنات الحيوانية — والسابق ذكرها — أهمية خاصة لما يترتب عليها من نتائج : غاية فى الأهمية فى مجال تربية وتحسين الحيوان ، وكذلك معالجة الجينات الخاصة بالأمراض الوراثية الآدمية .

مزارع الخلايا النباتية والهندسة الوراثية فى النباتات الراقية:

يمكن تناول مزارع الخلايا النباتية بطرق عدة ، وهى مشابهة بدرجة كبيرة — وان كانت تختلف جوهريا — للتقنيات المستعملة فى الخلايا الحيوانية . وأهم اختلاف ، هو أن نباتا كاملا يمكن أن يتولد من خلية واحدة مُعالَجة وراثيا فى مستنبت ، وهذا ذو فائدة غاية فى الأهمية فى مجال تربية وتحسين النباتات الزراعية . وقد تناولنا بعضا من هذه التقنيات بإيجاز فى الباب ١٦ .

استخدامات هجن خلايا الثدييات:

يستخدم مهندسوا الوراثة هجن خلايا الثدييات — كإحدى تقنيات الهندسة

الوراثية فى الكائنات العليا — فى مجالات عدة ، نوجزها فيما يلـــــى :

(١) استخـدام الطوافر فى المزارع الخلوية الراسخة :

لكى يتمكن الباحث الوراثى من إجراء تحليل وراثى على مستوى خلايـــا الكائنات الثديية النامية فى مستنبتات خلوية ، يتطلب الأمر توافر مجموعـة مـــن الطوافر الخلوية لدراستها. ويلزم للمعـالجة الوراثية لخلايا الثدييات الأخــذ فى الاعتبار طبيعة ونشأة الطوافر فى مزارع الخلايـــا .

وكثير من فئات الطوافر المستعملة فى دراسة وراثة خلايا الثدييـــــات تماثل تلك التى وجدت فى البكتريات. وفى كلتا الحالتين من المحتمل أن أسهل الطوافر التى يمكن عزلها هى التى تُظهِر مقاومة متزايدة لاحد العقاقير الطبية (الشكل ١٧—٢) . وفى هذا المثال تُفَرَّد خلايا الطراز البرى العاديـــة فى بيئات متزايدة التركيز من العقار الطبى (drug) ، حيث يمكن الحصول على منحنى القابلية للحياة viability للطوافر التلقائية القادرة على النمـو عنـــد تركيزات تقتل خلايا الطراز البرى . وقد تظهر الطوافر المقاومة بتكـرار 1×10^{-6} (= ١ فى المليون ، ويمكن زيادة هذا التكرار بالمعاملة بالمطفرات mutagens) . ويمكن عزل الطوافر المقاومة من تفريد عشيرة مــــن الخلايا العادية قوامها 10^{7} خلية فى تركيز مناسب من العقار تحت الدراســة .

والمثال العملى الواضح الذى يمكن أن نسوقه هنا هو المقاومة لعقـــار (الأزا جوانين azaguanine " والذى أستعمل على نطاق واســع فى المزارع الخلوية الحيوانية . وتتميز هذه المادة بخصائص جعلتها ذات فائـــدة خاصة فى دراسة وراثة خلايا الثدييات. ويلاحظ أن الازاجوانين " هو أحـــد نظائر الجوانين . فلو تواجد "الازاجوانين " فى بيئة النمو ، تقوم الخلايـــا بإيلاجه فى الدنا الخاص بها ، ويؤدى إلى قتلها . ولقد وجد أنّ أحـــد

الانزيمات المتداخلة فى عملية الايلاج هو إنزيم "الهيبوزانثين ـ جوانين ـ فوسفو ريبوسيل ترانسفريز = HGPRT" ،وهو يُحوّل البيوريناات (كالجوانين مثلا) إلى نوتيدات (مثل جوانوزين أحادى الفوسفات) ،وهذه تستعمل بعد ذلك فى تخليق الد ن أ . أما فى الخلايا المقاومة للازآجوانين ،يكون هذا الانزيم ذا تركيب مختلف يمنعه من القيام بوظيفته ،ومن ثمّ لايولج الازآجوانين فى د ن أ الخلايا . ويترتب على ذلك أن تكون الخلايا الطافرة قادرة على الحياة فى وجود هذا العقار ،كما وجد أنّ نقص إنزيم ال HGPRT لايكون مميتا للخلية . ويشاهد نفس القصور البيوكيميائى فى المزارع الخلوية المأخوذة من مرضى مصابون بمرض وراثى آدمى يسمى تناذر "ليش ـ نيهان Lesch-Nyhan syndrome" فالمرضى المصابون بهذا المرض ينقصهم إنزيم ال HGPRT ،ولديهم قدرة متزايدة لتخليق البيورين من جديد .ويؤدى هذا النوع من التمثيل الغذائى الشاذ إلى أعراض إكلينيكية كالرعشة وتأخر النمو وفشل السيطرة على تحريك الأطراف ،كما أنّ الافراد المصابين لديهم تشوه ذاتى (نتيجة عض الشفاة والاصابع) .

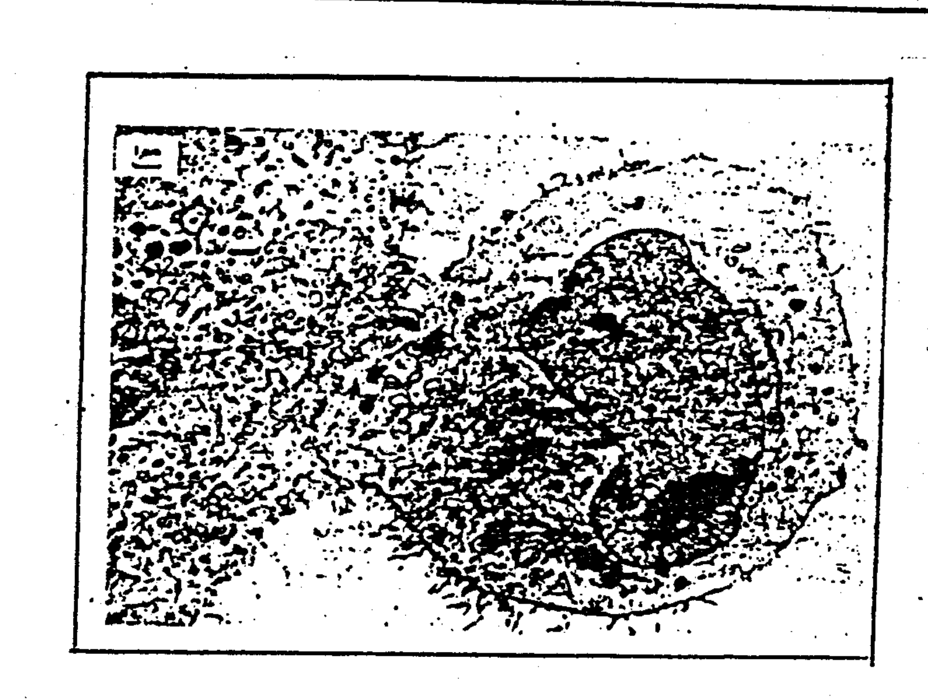
وتوجد طُرُز أُخَر من الطوافر الخلوية والتى لها احتياجات اغتذائية إضافية . فعلى سبيل المثال ،نجد أنّ خلايا الفأر (الهامستر hamster) النامية فى المزارع الخلوية لاتتطلب عادة تواجد الحمض الأمينى "برولين proline" فى بيئة النمو ،إلاّ أنه يمكن عزل طوافر لها هذا الاحتياج الاغتذائى ،وذلك لقصورها فى إنزيم ضرورى للتخليق الحيوى لهذا الحمض الأمينى . ولقد تَحَيّر علماء وراثة الخلايا ـ لبعض الوقت ـ فى واحدة من الخصائص العامة للطفرات فى مزارع خلايا الثدييات. ففى علم الوراثة التقليدى للكائنات العليا ،ينظر للطفرات على أنها متنحية أو سائدة . وفى معظم الأحيان تكون النسخة الطافرة للجين (الأليل الطافر) متنحية لنسخة الطراز البرّى (الأليل البرى) .

ولقد وجد أنه عند ما تندمج خلايا الثدييات،أو عند ما يتم نقل الجينات في مزارع الخلايا ،عادة ماتكون الأليلات الطافرة متنحية ،كما هو متوقع. وبالرغم من ذلك ،يبدو أن هناك تناقضا ،لأنه في البداية عند ما تعزل الطفرات من مزارع الخلايا ،فإنّ هذه الطفرات المتنحية سوف تُعْزَل في خلايا ثنائية المجموعة الكروموسومية ،والسؤال المطروح هو: لماذا لاتُقَنَّع هذه الطفرات بواسطة الأليلات البرية السائدة والتي من المتوقع أن تكون موجودة في الكروموسومات النظيرة؟ والآن يتضح أنّ بعض الطفرات (وبضمنها طفرة المقاومة للأزاجوانين السابق ذكرها) تكون في الكروموسوم X ،حيث توجد منها نُسْخَة واحدة في خلايا الذكر ،كما أنّ نُسْخَةً واحدة منها تكون فعّالة في خلايا الأنثى (وتكون النسخة الأخرى موجودة ولكنها في حالة غير فعالة وتسمى جسم بار (Barr body) ،ومن ثم لاتظهر مشكلة السيادة. وأحيانا يكون التفسير الآخر هو أنّ هذه الخلايا في المزارع الخلوية الراسخة عادة ماتكون قد فقدت بعض المقاطع الصغيرة من بعض الكروموسومات ،ومن ثم لوأنّ طفرة ظهرت في منطقة مقابلة للكروموسوم النظير ،فسوف لاتظهر مشكلة السيادة مرة أخرى ، حيث توجد نسخة واحدة فقط من الجين الموجود .

(٢) الاندماج الخلوي ورسم خرائط الجينات الآدمية :

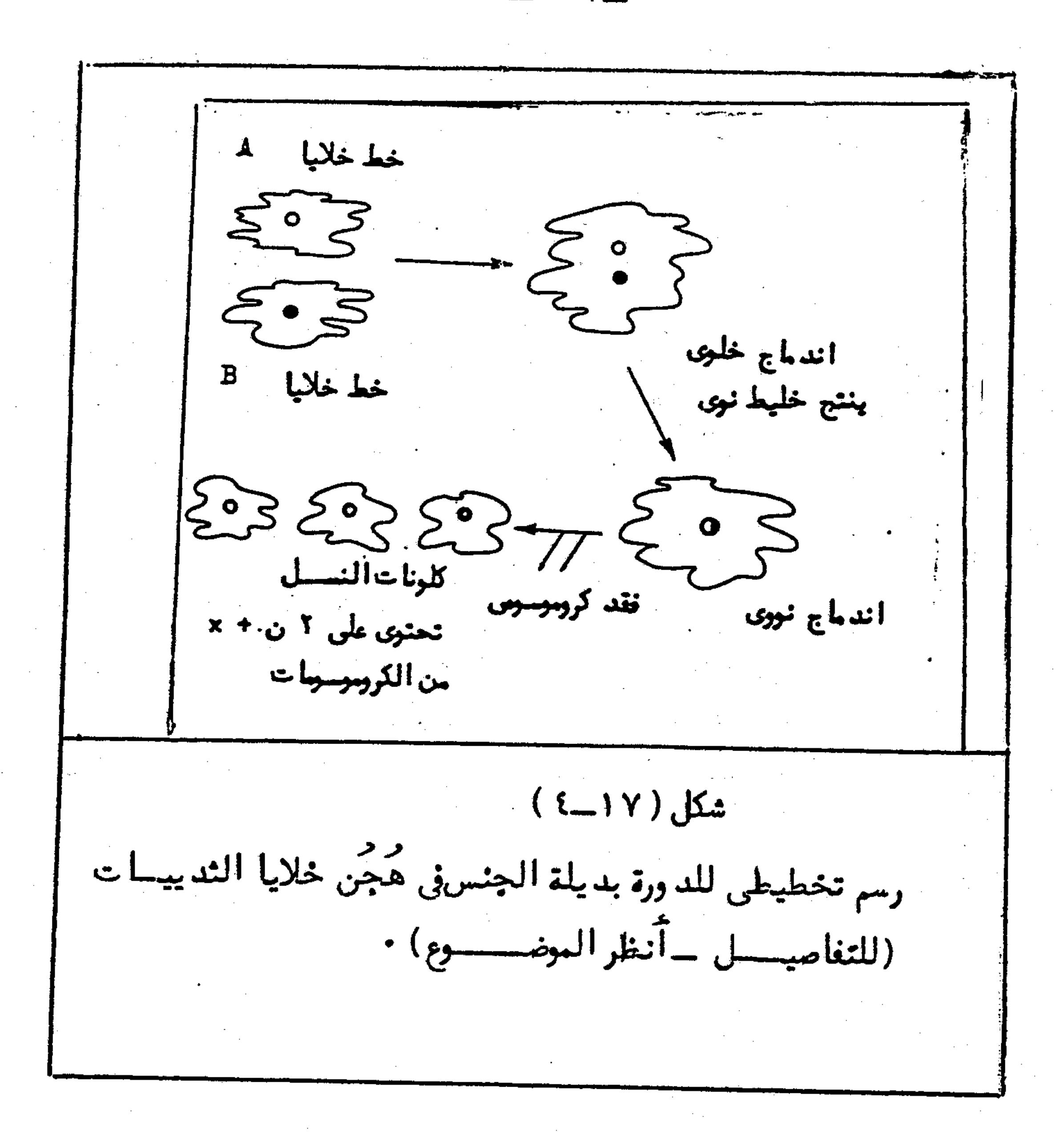
عند ما يُنَمَّى خطان خلويان cell lines في وعاء مزرعة واحدة قد يحدث اندماج خلوي (الشكل ١٧—٣) يعقبه اندماج نووي لانتاج خط خلوي بهيئة كروموسومية مشتركة. وهذا النموذج مماثل الى حد ما للدورة بديلة الجنس في فطر الأسبرجلس (الشكل ١٧—١) . ويمكن أن يحدث الاندماج مابين خلايا من نفس النوع أو من أنواع مختلفة . فلوكان الاندماج الخلوي الأولي بين

خلايا مزرعة أولية لنوع ما وخلايا مزرعة راسخة لنوع آخر ، فقد يحدث فقد سريـع لبعض الكروموسومات من الخلية الهجينة أثناء الانقسامات الميتوزية التالية، إلـى أن تثبت المستعمرات (الكلونات) عند هيئة كروموسومية أعلى نسبيا من المستوى الثنائي (٢ن + س ، حيث ٢ن تمثل العدد الكروموسومي الثنائي ، و س = عدد قليل متغير) كما هو موضح تخطيطيا في الشكل (ط١٧ـ٤) • وسوف نناقـش فيمايلي تفاصيل هذه التقنية واستعمالاتها في وراثة الانسـان •



شكل (١٧ـ٣)

صورة واقـعية لاندماج خليتين من خلايـا الثدييـات •



شكل (١٧ـ٤)

رسم تخطيطى للدورة بديلة الجنس فى هُجُن خلايا الثدييات (للتفاصيل ـ أنظر الموضوع) ٠

لمحة تاريخية عن الاندماج الخلوى فى الكائنات الثديية :

منذ أكثر من ١٠٠ عام تمكن العلماء من رؤية خلايا عديدة النوى فى الفقاريات Vertebrates بنسبة عالية ، خاصة أثناء الاصابة بالفيروسات مثل عدوى اللوزات أثناء الاصابة بالحصبة ٠ كما أمكن أيضا رؤية خلايا عديدة النوى فى مزارع الانسجة منذ عام ١٩٥٤ ، حيث تبين أن فيروسات الحصبة

وفيروسات الغدة النكفية وفيروسات الانفلونزا تسبب اندماجا خلويا فى مزارع الانسجة الحيوانية . وفى عام ١٩٦٠ أوضح العالم ج . باريسكى أنّ المزارع المختلطة لنوعين من الخلايا تحتوى على بعض الخلايا الهجينة ،حيث نواتان لنوعين مختلفين قد اندمجتا معا لتعطيان نواة واحدة حاملة لكروموسومات كلا نوعى الخلايا . وبعد ذلك بقليل تمكن العالم ب. إفروزى من تنمية خطوط خلايا هجينة نقية فى مستنبتات خلوية . وفى عام ١٩٦٥ تمكن كل من هـ. هاريس و ج . ويتكنز من عزل هُجن تكونت ما بين خلايا مشتقة من نوعين مختلفين (على سبيل المثال خلايا الفأر الصينى وخلايا الانسان) . وهذا الاكتشاف المثير له أهمية خاصة فى وراثة الانسان .

ولما كان عدد قليل من الخلايا ،فى خليط من خلايا طرازين مختلفين هو الذى يندمج ،فقد عكف العلماء على تصميم تقنيات تحقق : (أ) زيادة عدد الاندماجات الخلوية،و (ب) انتخاب الهُجُن النادرة من مخاليط الخلايا الابوية .

استخدام فيروس ساندای Sandai فى زيادة عدد الاندماجات الخلوية:

إنّ أكثر الطرق استعمالا لزيادة تكرارات الاندماجات الخلوية يتلخص فى تعريض مخاليط خلايا المزارع لفيروس ساندای (وهو أحد مجموعة فيروسات الانفلونزا) المثبط بالاشعة مافوق البنفسجية (UV-light) . ويبدو أنّ الفيروس يَطْمر نفسه فى أغشية الخلايا المتجاورة مفضلا تحليلها . ويترتب على ذلك تكوين قنوات سيتوبلازمية بين هذه الخلايا المتجاورة تسمح بالاندماج الخلوى . ولقد وُجِدَ أنّ الاندماج الخلوى يمكن أن يحدث إذا عُرِّضت خلايا المزرعة لفترة قصيرة لمادة البولى إثيلين جلايكول polyethylene glycol.

انتخاب الهجن النادرة من مزارع الخلايا :

يمكن أن يتم انتخاب هجن الخلايا الثديية النادرة من بين الاعداد الهائلة من الخلايا غير المندمجة باستعمال بيئات نمو تسمح فقط للخلايا الهجينة بالبقاء على قيد الحياة . واحدى البيئات شائعة الاستعمال هى المسماة بـ " تكنيك الانتخاب هات HAT selection " ، والذى صممه العالم ج . ليتلفيلد . ويتلخص التكنيك فى عمل مزرعة من خط خلايا أبوى مقاوم للازاجوانين (منقوص للانزيم HGPRT ـ أنظر انتخاب الطوافر الخلوية فى الجزء السابق) وخط خلوى آخر TK^- منقوص للانزيم ثيمين كينيز ويضاف للبيئة أمينوبترين لتثبيط المسار الجديد للإنزيم HGPRT . والتأثير النهائى للطفرات وللعقار الطبى هو أنّ كلا خطى الخلايا الأبوية لا يمكنه النمو فى بيئة هات HAT (وهى تحتوى على هيبوزانثين ـ أميتوبترين وثميدين) . أما إذا حدث اندماج خلوى ، فلسوف يساهم كل طراز أبوى بنسخة برية الطراز من الجين الذى يكون منقوصا للنسخة الأخرى فى الهجين الناتج . ومن ثَمَّ ، فالطافر الذى يكون TK^- يحمل أليلا فعّالا للانزيم HGPRT ، والطافر الآخر الذى يكون $HGPRT^-$ (سالب للانزيم) يحمل أليلا فعالا للانزيم ثيمين كينيز Thymine kinase(TK^-) .

ويترتب على ذلك أنّ الهجين الخلوى يكون خليطا للجين الخاص بالانزيم HGPRT (أى $HGPRT^+/HGPRT^-$) ، وأيضا خليطا للجين TK (أى TK^-/TK^+) ولكون الجينات الطافرة متنحية ، لذلك يكون مظهر الهجين الخلوى برى الطراز ، ومن ثمّ يمكنه النمو فى بيئة هات HAT ، حيث يمكن عزله من بين الخلايا الأبوية التى لا يمكنها النمو هذه البيئة .

ولقد وُجِدَ أنّ الهجن الخلوية التى تتكون ما بين خلايا أبوية تابعة

لنفس النوع أو تابعة لانواع شديدة القرابة ،عادة ماتكون أكثر ثباتا • وتنقسم هذه الهُجَن خضريا ،ويحدث أحيانا فَقْد لبعض كروموسوماتها • وبالرغم من ذلك فقد أوضحت الباحثة مارى وايز Mary Weiss (١٩٦٧) أنّ الهُجُن الخلوية " الانسان — الفأر الصينى " قد فقدت كروموسوماتها بسرعة عالية ، كما وَجَدَت أنّ الكروموسومات الآدمية هى التى فُقِدَت تفضيليا • ولذلك فبعد ٢٠ جيلا خلويا احتوت هذه الهجن على جميع كروموسومات الفأر و٢—١٥ كروموسوما فقط من الكروموسومات الآدمية • ولقد وجد أنّ الفقد التفضيلى للكروموسومات يستمر حتى بعد ١٠٠ إلى ١٥٠ جيلا من الخلايا • ويحدث الثبات عندما يتبقى من ١ إلى ٣ كروموسومات آدمية مع كل كروموسومات الفأر • ويحدث الفقد التفضيلى لكروموسومات أحد الانواع فى الهجن النوعية الأخبر بطريقة مماثلة • ولقد وجد أنّ خطوط خلايا مختلفة تنشأ بمثل هذا التتابع من الاحداث ،وهى تحتوى على كروموسومات آدمية بأعداد مختلفة • ومن الواضح أنّ كلونات النسل هذه قد تشأت بواسطة الفقد الكروموسومى أثناء الانقسامات الميتوزية وليس بأى نوع من العملية الميوزية •

والنتيجة النهائية لهذا التتابع من الأحداث هو تكون كمّ هائل من التوليفات المختلفة للمادة الوراثية الآدمية فى مستعمرات النسل الخلوى • ولقد استغل علماء الوراثة هذه المستعمرات الخلوية لإجراء دراسات مستفيضة عن وراثة الانسان •

رسم خرائط الجينات الآدمية باستخدام الهجن الخلوية :

أستغل علماء الوراثة تكنيك اندماج خلايا الثدييات (كدورة بديلة للجنس) فى توقيع بعض الجينات فى كروموسومات الانسان • وأول جين آدمى وُقّع خريطيا بهذه الطريقة كان الجين المسيطر شفريا على تخليق انزيم الثيمين كينيز (TK) فقد تم اندماج خلايا آدمية حاملة لجين TK^+ مع خلايا فأر حاملة للطفرة TK^-

(فاقدة للإنزيم) ،حيث تكونت خلية هجينة تركيبها الوراثى TK^{+}/TK^{-} حاوية لإنزيم الثيمدين كينيز الفعّال ،مما يثبت أنّ الأليل TK^{+} سائد على الأليل TK^{-} . وعندما يبدأ هذا الهجين الخلوى فى الانقسام وفقد الكروموسومات الآدمية ،فإنّ جميع المستعمرات (الكلونات) الناتجة سوف تحتوى على الجين TK^{-} الخاص بالفأر ،ولكن بعضا منها سوف يحتوى فقط على الكروموسوم الآدمى الحامل للجين TK^{+} الآدمى والبعض الآخر لا يحتويه . والكلونات التى تحتوى خلاياها على الكروموسوم الآدمى الحامل TK^{+} سوف يكون تركيبها الوراثى (TK^{-}/TK^{+}) وتعطى المظهر TK^{+} ،والكلونات التى لا تحتوى خلاياها على الكروموسوم الآدمى الحامل للجين TK^{+} سوف يكون تركيبها الوراثى TK^{-} ، و من الطبيعى أن يكون مظهرها TK^{-} ومن حسن الحظ يمكن تمييز المظهرين TK^{+} و TK^{-} من بعضهما لأنّ المظهر TK^{-} يكون أيضا مقاوما للعقار الطبى بروموبوراسيل Bromouracil (BU) .

بعد ذلك تُختَبر مستعمرات النسل وتُصنّف على أساس معيارين : الاول يُصنِّف الكلونات إلى TK^{+} و TK^{-} ،والمعيار الثانى يُصنِّفها على أساس فحص كروموسومات خلاياها سيتولوجيا ،ثم تُجَهّز قائمة يبين فيها أيّ الكروموسومات الآدمية هو الموجود فى مستعمرات النسل . ويُمكّن نوعا المعلومات المتوافرة من معرفة تواجد الجين TK^{+} فى أيٍّ من الكروموسومات الآدمية . وفى الحالة التى نعرضها اتضح أنّ هذا الجين محمول فى الكروموسوم الآدمى رقم ١٧ .

وبعد هذا الاكتشاف المثير أمكن تحديد مواقع العديد من الجينات الآدمية وبضمنها عديد من الجينات ذات الأهمية من الناحية الطبية وربطها بكروموسوماتها الموجودة فيها باستعمال تكنيكات مماثلة . فعلى سبيل المثال ، قد أمكن توقيع الجينات المسئولة عن سلاسل الالفا وسلاسل البيتا هيموجلوبين الآدمية (α-and β-haemoglobin chains) (والتى قد تكون معيبة

فى بعض أنواع الانيميا) خريطيا على الكروموسومات رقم ١٦ و ١١ على التوالى. ويُحَوَّر التكنيك قليلا فى حالة جينات الجلوبين ،حيث أنّ هذه الجينات لا يمكنها التعبير عن ذاتها فى مثل هذه المستنبتات الخلوية ،ومن ثم يجب أن تختبر مستعمرات النسل لوجود تتابع الد ن أ الخاص بجين الجلوبين الآدمى باستعمال تكنيك تهجين الأحماض النووية (مسابر الد ن أ ـ الباب ١٤) ،وليس بالبحث عن متعددة ببتيدات الجلوبين الآدمى فى المستعمرات المختبرة • وباستخدام هذه التقنيات أمكن خريطيا توقيع جين يُضْفِى حساسية غير عادية لفيروس يسبب عيوبا تنفسية (فيروس كورونا Coronavirus) وذلك فى الكروموسوم الآدمى رقم ١٥ •

تحديد الارتباط بين الجينات الآدمية من تحليل انعزالات الهجن الخلوية :

يوجد نوع آخر من المعلومات التى يمكن اشتقاقها من مستعمرات النسل للدورة بديلة الجنس فى هجن خلايا الثدييات ،وهو ماإذا كان جينات مرتبطان على نفس الكروموسوم أو موجودان فى كروموسومين مختلفين •

دعنا نأخذ فى الاعتبار هجينا بين خط خلوى من الفأر يكون طافرا لجينين (ولنفرض أنهما B^- و A^-) يكون قد أدمج مع خط خلوى آدمى يكون حاملا لنفس الجينين (B^+ و A^+) كما يتضح تخطيطيا من الشكل (١٧ـ٥) • فلو تصادف وجود الأليلين B^+ و A^+ على نفس الكروموسوم الآدمى ،فإنّ مستعمرات النسل إما أن تكون حاملة لهذا الكروموسوم ،ومن ثَمّ سوف تكون هذه المستعمرات A^+B^+ ،أو قد لا تكون حاملة لهذا الكروموسوم ،ومن ثَمّ سوف تكون هذه المستعمرات A^-B^- (لاحظ عدم وجود عملية انقسام ميوزى ،وبناء على ذلك سوف لا تتكون كيازمات تؤدى إلى تكوين توليفات A^+B^- أو A^-B^+) • وعلى النقيض ،لو كان كل من A و B فى كروموسومين آدميين مختلفين ،فإنّ مستعمرات النسل قد

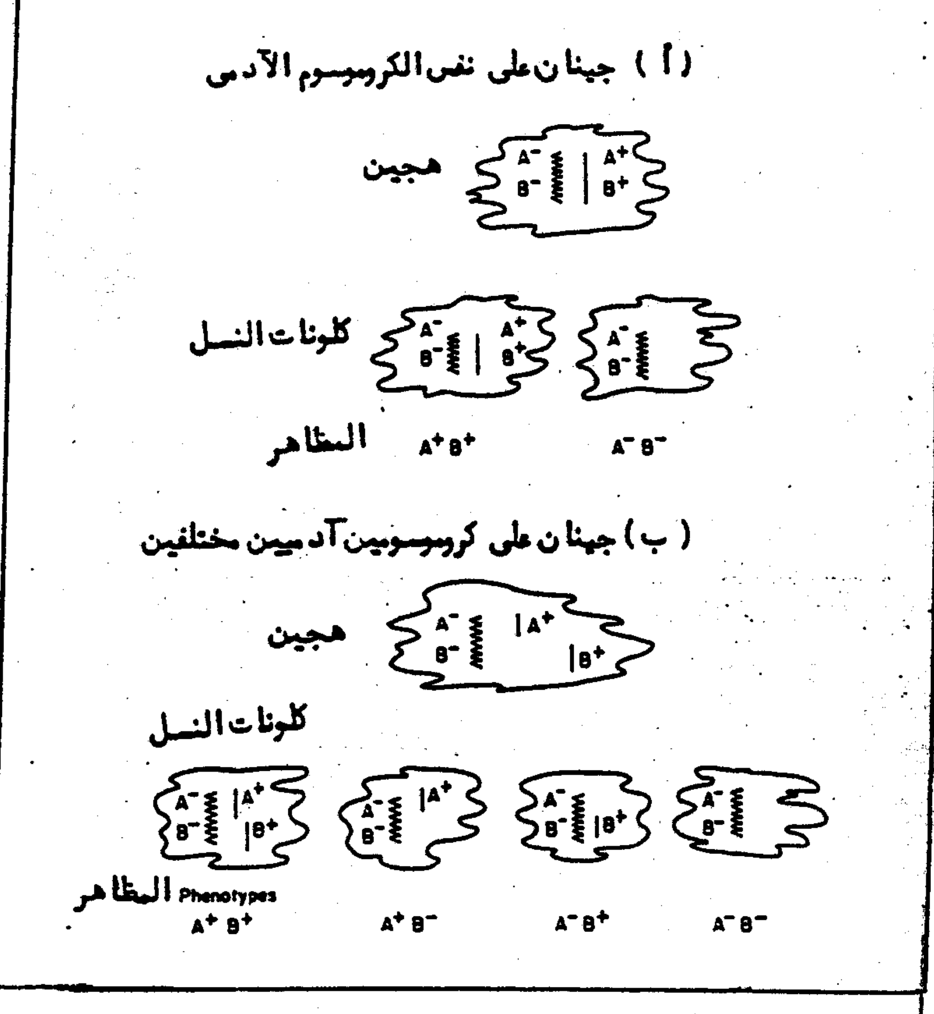
تحتوى على التوليفات الوراثية الأربع: ( ) (A^+B^-) (A^-B^+) , (A^-B^-) • ولكـــن سيكون النسل الناتج A^+B^+ أو A^-B^- عند ما يكون الجينان فى نفس الكروموسوم الآدمى ، وبناء على ذلك يكون مـــن الممكن تقرير ما إذا كان الجينان مرتبطين فى نفس الكروموسوم ، أم أن كلا منهما يقع فى كروموسوم مستقـــل •

ولقد أمكن تطوير تكنيكات لتحديد المسافة التقريبية بين الجينـــات المرتبطة من خلال الدورة بديلة الجنس ، وأحسن طريقة لذلك هو استخـدام خلايا آدمية تحمل تنوعا من الكسرات الكروموسومية عقب التعريض الشديـــد للإشعاع لأحد الخطوط الخلوية الأبوية فى التهجين بديل الجنس. فكلما كان الجينان أكثر بعداً فى نفس الكروموسوم ، فإنّ الاحتمال يكون أكبر لأنْ تتكـون كســرات كروموسومية بالاشعاع بينهما ، ومن ثم سينفصلان بتكرار أعلى أثناء الدورة بديلة الجنس • وتوجد أساليب رياضية مستخدمة فى تقديـر المسافــات الجينية التى تفصل بين الجينات ، لكنها معقدة للغاية ولا يتسع المجال هنـــا لعرضهـــا •

التطبيقات العلمية والعملية لخرائط الجينات الآدمية:

لقد أدى استعمال تكنيكات الهندسة الوراثية المتطورة هذه مع أساليب الوراثة التقليدية إلى تزايد سريع فى المعلومات عن الخريطة الوراثية الآدميـة. فقد أمكن حتى الآن تحديد مواقع عدة مئات من الجينات الآدميـــة علـــى كروموسوماتها ، ومن بينها أكثر من ٢٠ جيناً فى الكروموسوم رقم ١ ، وأكثر مـــن ١٠٠ جين فى كروموسوم الجنـــس.

والمعلومات المتوافرة عن الخريطة الوراثية الآدمية ذات أهمية فى البحوث الأساسية والبحوث الطبية على حدٍّ سواء • ففى المجال الأول ، سوف نجد أنّ



شكل (١٧ـ٥) : رسم تخطيطى يبين كلونات النسل من هجن خلوية حاملة لجينين آدميين B , A ناتجة من هجين "فأر ـ إنسان". (أ) عند ما يكون الجينان فى نفس الكروموسوم ، (ب) عند ما يكونا فى كروموسومين مختلفين • الكروموسومات الآدمية = الخطوط المستقيمة كروموسومات الفأر = خطوط المتعرجة • لم ترسم بقية الكروموسومات الأخرى فى الخليـــة •

المعلومات المتوافرة عن الجينات ذات العلاقة فى وظائفها ،والتى تكون متجمعة مع بعضها على نفس الكروموسوم ،قد تؤدى إلى معرفة الطريقة التنظيمية التى تؤدى بها هذه الجينات وظائفها (أنظر جينات الهيموجلوبين فى الباب ١٥) . كما يمكن تحديد التتابعات النوتيدية لمقاطع دنا هذه الجينات ورسم خرائط تحديد لها واستعمالها فى تشخيص بعض الأمراض الوراثية . ويقوم علماء الوراثة فى الوقت الحالى بعمل مسح شامل للخريطة النوتيدية الآدمية ،وينتظر الانتهاء من هذه الخريطة قبل حلول عام ٢٠٠٠ .

أما فى مجال الطب ،فإنّ توافر خريطة وراثية آدمية يكون ذا أهمية قصوى فى مجال الاستشارات الوراثية . فالعيوب الوراثية قد لاتكون قابلة للتعرّف عليها فى خلايا السائل السلّى للجنين بواسطة عملية "البَذْل السّلى amniocentosis" وبالرغم من ذلك لوكان جين لعيب ما شديد الارتباط بطفرة يمكن التعرف عليها فى خلايا السائل السلّى ،فإنّ تواجد هذه الطفرة يمكن ادراكه ، كما أن احتمال تواجد هذا العيب الوراثى يمكن أيضا أنّ يكون موجودا ،كما يمكن تقدير نسبته . وفى مثل هذه الحالة يمكن إسداء النصح للأمّ التى تفكر فى الاجهاض.

(٣) استخدام الاندماج الخلوى فى انتاج الأجسام المضادة النقية:

Use of Hybridomas in the Production of Monoclonal Antibodies(Mc Abs).

مقدمة:

منذ عام ١٩٧٥ ،خطى استعمال تكنيك الاندماج الخلوى -كأحد تقنيات الهندسة الوراثية فى الكائنات العليا - خطوات هامة ودخل فى مجالات جديدة ،عندما أعلن كل من العالمين ج . كوهلر ،و س. ملشتين تجاح عملية

اندماج خلايا من الطحال الفأر مع خط خلوى سرطانى راسخ. ولقد أفرزت الهجن الناتجة والمسماة الهيبرودومات Hybridomas ، طرازا محددا من الأجسام المضادة ، يعرف باسم "الجسم المضاد أحادى الكلون Monoclonal antibody. وكان لهذا الاكتشاف الهام دويا مثيرا فى عالم وراثة المناعة Immunogenetics .

لقد تم دراسة الأجسام المضادة منذ سنوات عديدة ، وأصبح من المعروف أنه عندما تتواجد مواد غريبة فى الدم ، فإنّ جسم الحيوان يستجيب لذلك بانتاج مجموعة خاصة من بروتينات الجلوبين المناعية تعرف باسم الاجسام المضادة (الباب ١٥) . وتسمى المواد الغريبة بالمولدات (أنتيجينات antigens) . فإذا دخلت مادة غريبة نقية واحدة فى الدم ، فإنّ ذلك يعتبر مولدة واحدة ، بينما لو دخل بكتريم واحد أو فيروس ، فقد يحتوى سطح كل منهما على عدة أنتيجينات (مولدات) ، ومن ثم سوف تتكون عدة أجسام مضادة فى جسم الحيوان كنوع من الاستجابة المناعية .

وبالاضافة لدورها الطبيعى فى الجسد الآدمى ، فإنّ الأجسام المضادة يمكن الحصول عليها للاستعمال الطبى ، أو للاستعمال فى مجالات البحث البيولوجى ، وذلك بالحقن المتكرر لمولدة فى حيوان كالأرنب مثلا . ولهذه الانتيجينات عيبان خطيران :

الأول : أنها غير نقية ، فبالرغم من استجابة الأرنب إلى للمولدة المحقونة ، إلّا أنّ جسده ينتج العديد من الأجسام المضادة الأخَر ضد المولدات الأخرى الموجودة فى نفس الوقت . وتكون النتيجة تخليق خليط من الأجسام المضادة والتى يكون من الصعب جدا تنقيتها من بعضها دون إتلافها .

الثانى : تتكون الأجسام المضادة بكميات محدودة .

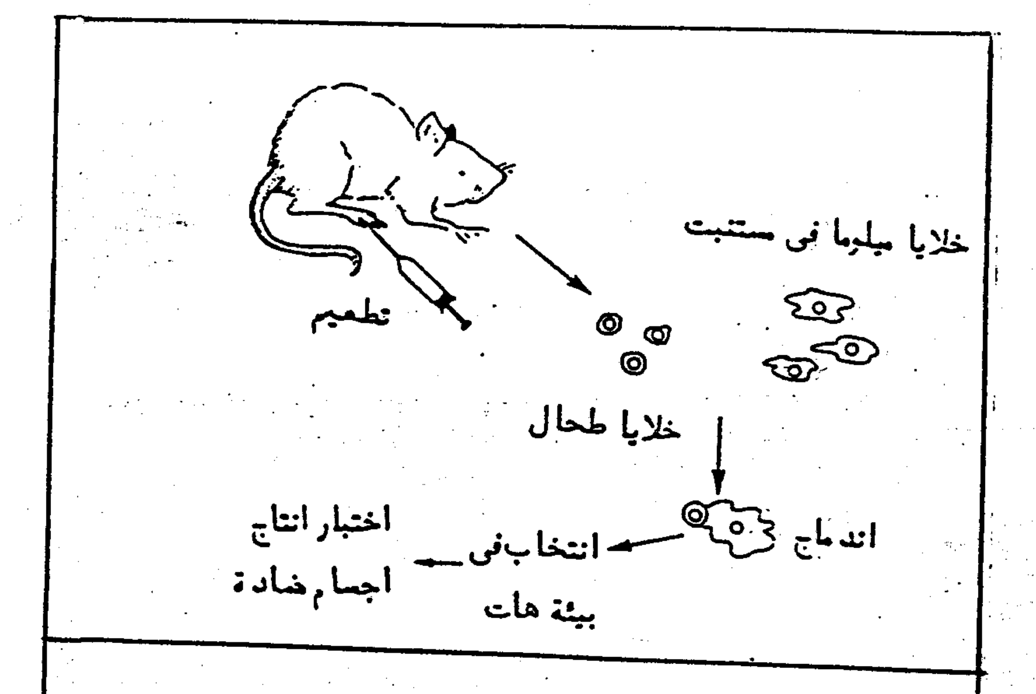
ويراود علماء المناعة الحلم منذ زمن بعيد لايجاد طرق لانتاج أجسام مضادة نقية بكميات وفيرة . لذلك يمكن القول بأنّ العالمين كوهلر وميلشتين قد فتحا الطريق واسعا لتحقيق هذا الهدف عن طريق استخدام الهجن الخلوية المسماة بالهيبريدوماتذ.

طريقة انتاج الهيبريدومات:

تام ميلشتين بزرع خلايا الميلوما meyloma (وهى نوع خاص من الخلايا السرطانية) كمستنبتات خلوية راسخة .وتقوم هذه الخلايا بإنتاج بروتينات الجلوبين المناعية .وهى مشابهة جدا ـ وربما مطابقة تماما للجوبينات المناعية والتى تعرف بالأجسام المضادة . ويلاحظ أنّ خلايا "الميلوما" يمكنها أن تفرز هذه البروتينات المناعية بمعدل عال جدا .كما أنه قد تم دراستها من الناحية الكيميحيوية لعدة سنوات كنظام نموذجى لانتاج الأجسام المضادة . وبالرغم من ذلك لازالت طبيعة الجلوبينات المناعية المفرزة بواسطة "خلايا "الميلوما" غير محددة بعد .

قام ميلشتين ومعاونوه بدمج خلايا "الميلوما" المأخوذة من فأر مع خلايا مشتقة من نسيج طحال الفأر سبق حقنها بمولدة معروفة (الشكل ١٧ـ٦) وسميت الهجن الخلوية الناتجة "بالهيبريدومات" . ولقد أمكن جعل خلايا طحال فردية تنهمك فى تخليق أجسام مضادة فردية .ومن ثمّ فقد وفّرت هذه الطريقة معلومات عن كيفية تخليق جسم مضاد خاص لكل هيبريدوما .

وتُوفّر خلايا "الميلوما" معلومات عن تخليق بروتينات جلوبين مناعية غير محددة . ومن ثم فقد أنتجت "الهيبريدومات" خليطا من الأجسام المضادة المحددة والجلوبينات المناعية غير المحددة . ومنذ وقت قريب أمكن عزل



شكل (١٧ـ٦) : رسم تخطيطى لخطوات تكنيك انتاج الهيبريد ومات. يحقن فأر بمولدة عدة مرات ،ثم تعزل خلايا الطحال وتهجن مع خلايا "ميلوما "وتنمى الهجن فى مستنبت على بيئة "هات" لانتخابها ثم يجرى اختبار لإنتاج الأجسام المضادة .

خطوط خلايا طافرة . من "الميلوما "ــ فقدت قدرتها على إنتاج الجلوبينات المناعية ،ولكنها كانت محتفظة بقدرتها على الاندماج مع خلايا الطحال ،وفى هذه الحالة كانت تُفْرِز أجساما مضادة فردية محددة وراثيا بواسطة خلايا الطحال فقط . وقد أطلق العلماء على هذا النوع من الأجسام المضادة اسم "الأجسام المضادة وحيدة الكلون Monoclonal antibodies" وللاختصار يرمز لها بالرمز (Mc Abs) (أنظر الشكل ١٧ــ٧) .

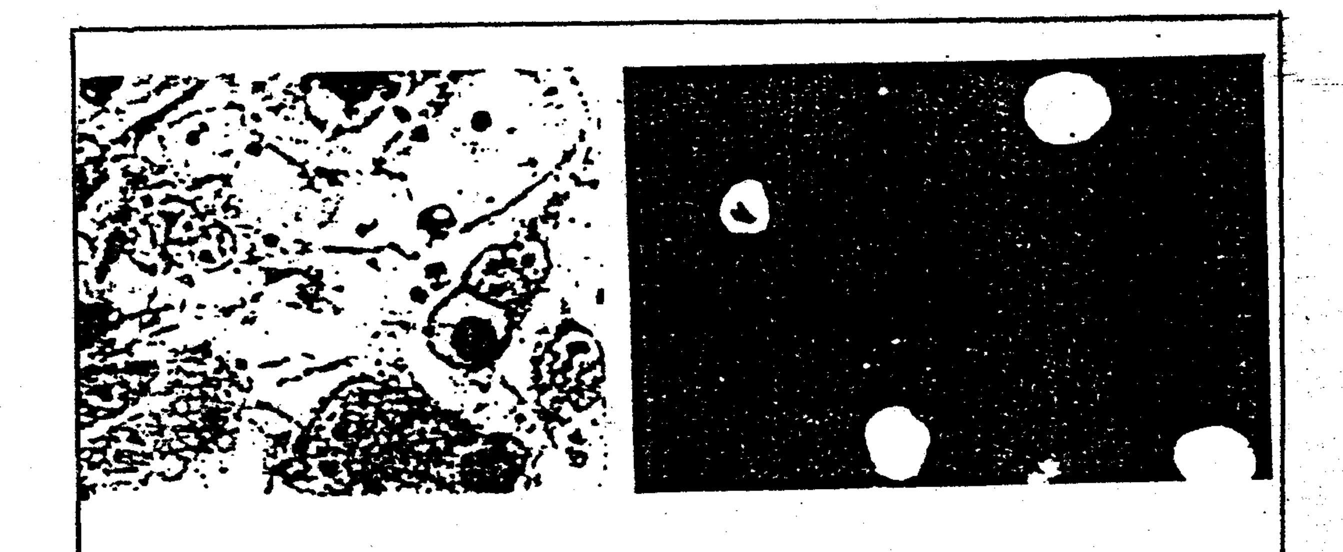
ولقد وجد أن اندماج خلايا الطحال مع خلايا الميلوما (السرطانية) بمعدل منخفض قدر بحوالى خلية واحدة من كل ١٠٠٠ خلية ميلوما يمكنها أن تعطى هجينا قابلا للحياة . وتستعمل مادة البولى إثيلين جلايكول لزيادة تكرار الاندماج الخلوى . ولقد بذل البحاثة جهودا جبارة لتوفير الظروف المثالية لتنظيم عملية الاندماج الخلوى هذه ،منها :

أــ ضبط النسبة بين خلايا الطحال وخلايا الميلوما .

بــ تحديد درجة تركيز أيون الهيدروجين (pH) المناسبة فى المزرعة .

جــ توفير العوامل المُحَدِّدة الأُخر ،وخاصة نوعية المصل المناسب فى البيئة .

وتنهمك الخلايا الفردية المأخوذة من طحال الفأر فى إنتاج أجسام مضادة مختلفة إستجابة لمولدات مختلفة . والفأر الذى تؤخذ منه خلايا الطحال سوف لايمكنه أن يتجنب التعرض لكثير من المولدات البيئية ،ومن ثم فسوف تضطر خلاياه لانتاج عديد من الأجسام المضادة فى البداية وبالرغم من أن مولدة منتخبة قد حقنت فى الحيوان قبل بداية التجربة لتزيد من نسبة خلايا الطحال المدفوعة لانتاج الجسم المضاد المرغوب ،إلاَّ أنّ عديدا من الخلايا الأخرى سوف تكون موجودة فى مستحضر خلايا الطحال .ويترتب على ذلك أن الهيبريدومات الناتجة تكون خليطاً من الأنواع المختلفة ويتوقف ذلك على خلايا الطحال الأبوية الداخلة فى الاندماج . وبناء على ذلك يجب أن تُخْتَبَر الهيبريدومات



الشكل (١٧-٧)

إدراك وجود الكلاميديا باستعمال الأجسام المضادة وحيدة المستعمرة ·
وقد أمكن معرفة تواجد الكلاميديا فى داخل الخلايا (ناحية الشمال) باستعمال صبغة اليود (المناطق الداكنة) وفى ناحية اليمين باستعمال الأجسام المضادة وحيدة المستعمرة مرتبطة بصبغة فلورسنتية (المناطق البيضاء) ·

فرديا ، وذلك لعزل الهجين الذى ينتج الجسم المضاد المطلوب وعند ما تعزل الهيبريد وما المرغوبة ، يمكن استزراعها إلى مالانهاية كمزرعة خلوية راسخة .

إنّ إنتاج الأجسام المضادة ليس خاصية ثابتة للهيبريد ومات ، فبعضها قد يفقد هذه الخاصية تلقائيا أثناء الاستزراع الروتينى . ويحدث ذلك فى بعض الحالات نتيجة فَقْد الكروموسومات الحاملة للجينات المسئولة عن إنتاج الأجسام المضادة أثناء تكرار الاستزراع . وقد أمكن التغلب على هذه المشكلة باستحداث طفرات فى جينات أخر تكون محمولة فى نفس الكروموسوم "(جينات واسمة) ، مثل جينات تخليق بروتينات الجلوبين المناعية . وبعد ذلك تنمى الهيبريدومات فى بيئات تناسب الخلايا الحاملة لهذه الطفرات . وتعطى هذه الطريقة قدرة انتخابية إيجابية للهجين المقاوم للعقار الطبى ، ومن ثم للكروموسوم الحامل للجين المسئول عن إنتاج الجسم المضاد .

وعند ما تعزل الهيبريدوما المناسبة تُنمّى بعد ذلك ـ إما فى آنية استزراع ، أو يمكن حقنها فى سوائل الجسم لفأر أو أرنب ، لوكانت خلايا الميلوما مأخوذة أصلا من حيوان من نفس النوع . وفى داخل الحيوان ، تنمو الهيبريدوما كورم بريتونى استسقائى (ورم يعيش حرا فى سوائل الجسم ، كمزرعة معلقة أكثر منه كورم جامد) . وتتلخص ميزة تنمية الهيبريدوما داخل جسم الحيوان فى أنّ ناتج الجسم المضاد يكون كبيرا جدا . ولقد وجد أن محصول الجسم المضاد فى آنية الاستزراع حوالى ١٠ و. ملليجرام لكل ١و. ملليلتر ، بينما يحمل دم أى حيوان عددا كبيرا جدا من خلايا السائل البريتونى تتراوح ما بين ٥ ـ ٢٠ ملليجرام لكل ١ و. ملليلتر . وعيب هذه الطريقة أنّ الجسم المضاد المُنتَج بواسطة هذا التكنيك يكون ملوثا ببروتينات أخر موجودة طبيعيا فى الدم ، ومن الصعب جدا تنقية الجسم المضاد المرغوب إلى درجة نقاوة أكثر من ٩٥ ٪ .

وقد سبق عرض بعض استعمالات الأجسام المضادة وحيدة الكلون في الباب السادس عشر ،كما تم بإيجاز عرض بعض من التقنيات الأخر للهندسة الوراثية في الكائنات العليا .

طريقة جديدة لانتاج الأجسام المضادة النقية باستخدام الاستزراع الجيني في خلايا النبات:

تفيد أبحاث الهندسة الوراثية المنشورة عام ١٩٨٩ ،والتى قام بها مجموعة من البحاثة فى جامعة كاليفورنيا ،الى نجاح التجارب الأولية التى أجريت لانتاج أجسام مضادة وحيدة الكلون (Mc Abs) لعدد من فيروسات الأمراض الحيوانية والنباتية ،وذلك باستزراع جينات معزولة من الفئران داخل الجهاز الوراثى لنبات الدخان . وبعد نمو النباتات حتى مرحلة الازهار ، تم اجراء تحليل لها وتبين وجود الأجسام المضادة المخلقة بداخلها وبكميات كبيرة . وهذه الطريقة توفر وسيلة رخيصة للحصول على الأجسام المضادة وحيدة الكلون monoclonal antibodies عن طريق النباتات كما هو الحال فى الحيوانات ،وتجرى حاليا محاولات لتطبيق هذا التكنيك فى نبات فول الصويا وغيره من النباتات لاكسابها مناعة ضد كثير من الفيروسات النباتية .

٤ ـ استخدام الاندماج الخلوى فى انتاج مخلوقات حيوانية جديدة :

لقد طُوِّرت تكنيكات الاندماج الخلوى الحيوانى ـ كوسيلة من تقنيات الهندسة الوراثية ـ بحيث أصبح فى الامكان دمج خلايا زيجوتية مع بعضها لانتاج هُجُن خلوية بينوعية . وتزداد درجة نجاح هذه الهجن كلما زادت درجة القرابة بين الأنواع الحيوانية المختلفة . وفى هذا

الاتجاه تمكن علماء فسيولوجيا الحيوان بالاشتراك مع علماء الهندسة الوراثية فى جامعة كمبردج بانجلترا من دمج زيجوت من الماعز مع زيجوت من الغنم ، ثم تم بعد ذلك استزراع الهجين الخلوى بين النوعى فى رحم أنثى من الماعز ، وبعد انتهاء فترة الحمل خرج كائن جديد يحمل صفات من كل من الماعز والغنم . وتبين الصورة المعروضة فى الشكل (١٧ـ٦) الحيوان الجديد والذى له رأس ووجه وآذان وذيل من الماعز وقرون وفراء من الغنم . ونقترح أن يُطْلَق على هذا المخلوق الجديد اسم " الماعزروف " . وليس من المعروف ما اذا كان هذا الحيوان خصبا أو عقيما ، إلاّ أننا نتوقع أن يكون هذا المخلوق الجديد على درجة عالية من العقم ، شأنه شأن البغل وهو الهجين بين النوعى الطبيعى الناتج من تهجين الحمار والحصان .

ولقد حققت الهجن الخلوية بين النوعية نجاحا كبيرا فى الكائنات النباتية بالمقارنة بنظيراتها الحيوانية . وتعرف تقنيات الاندماج الخلوى النباتى باسم " اندماج البروتوبلاستات Protoplast fusion ". ويمكن الرجوع الى مراجع الهندسة الوراثية فى الكائنات النباتية لمزيد من التفاصيل فى هذا الموضوع .



شكل (١٧-٦) : صورة واقعية لحيوان " الماعزروف " الناتج من التهجين الخلوى بين النوعى لزيجوت ماعز وزيجوت نعجة • لاحظ أنه يجمع صفات من كلا النوعين الحيوانين •

فهرس المصطلحات العلميـــة

تم ترتيب المصطلحات حسب تسلسلها بالحروف الانجليزية حتى يسهل على القارئ الرجوع إليها عند الضرورة ٠ وقد ذُكِر المصطلح الانجليزى مقابلا لترجمته العربية داخل كل موضوع فى الابْواب المختلفة ٠

أدنين : adenine

واحدة من القواعد النيتروجينية فى الـ د ن أ أو الـ ر ن أ.

آجار : agar

مادة تشبه الجيلاتين يمكن الحصول عليها من الاعْشـــاب البحرية :

حمض أمينى : amino acid

أحد وحدات بناء البروتين ٠

انزيمات تخليق أمينوأسيل الـ ت٠ر ن أ : aminoacyl-tRNA synthetases

فئة من الانزيمات التى تربط أحماض أمينية محددة مع جزيئات تـ ٠ رن أ ٠

أمينوبترين : aminopterin

عقار طبى يضاف لتثبيط بعض المسارات الكيميائية فى الخلية الحيوانيـــــة ٠

أمبسليـــن : ampicillin

مضاد حيوى ينتمى للبنسلين ،وكلا العقارين يقتل البكتريا عن طريـــــق منع تخليق جدار الخليـــة ٠

بذل سلي : amniocentesis

سحب السائل السلي من الجنين للفحص الطبي .

أجسام مضادة : antibodies

بروتينات تتعرف على وترتبط بأنتيجينات
(مولدات) ،وهي مكون هام لجهاز المناعة .

مضاد حيوي : antibiotic

عقار طبي يقتل البكتريات ،مثل التتراسيكلين
والبنسلين ..... وغيرها .

جين مقاوم لمضاد حيوي : antibiotic-resistance gene

جين يشفر لبروتين يسمح للبكتريم بالمعيشة في وجود العقار
الذي يقتل هذا الكائن ،وعادة ماتحتوي البلازميدات مثل
هذه الجينات.

كودون مضاد : anticodon

منطقة ثلاثية النوتيدة في الـ ت.رن أ
تكون تكاملية لكودون ثلاثي في الـ م.رن أ .

مولدة (أنتيجين) : antigen

مادة كيميائية أو ميكروب يمكن التعرف عليه أو يرتبط
بجسم مضاد .

ورم بريتونى استسقائى : ورم متحرك فى الجسم — ascites tumor

أسبرجلس نيد بولانز : فطر به دورة بديلة للجنس. — Aspergillus nidulans

أدنين ثلاثى الفوسفات: — ATP

مركب ذو روابط قوية الطاقة يمكن بسهولة هدمة بالانزيمات لاطلاق الطاقة اللازمة لدفع التفاعلات الحيوية فى الخلية .

تهدئة (تخفيض) : — attenuation

طراز من السيطرة على فعل الجينات يحتوى على اشارة داخل الم .رنأ لوقف انزيم بلمرة الرنأ عن الاستمرار فى اطالة جزىء الرنأ .

أزاجوانين : — azaguanine

مادة نظيرة للقاعدة البيورينية جوانين .

خلية ليمفاوية طراز (ب) : — B lymphocyte

طراز من الخلايا فى الثدييات ينتج أجساما مضادة .

مستنبت (مزرعة) بكتيرية : — bacterial culture

مرج من الخلايا البكتيرية ينمى على آجار صلب أو فى محلول بروث.

قاعدة : base

تكريب حلقى مسطح يحتوى نيتروجين ،كربون ،أوكسجين وهيد روجين وتكون جزءا من الوصلات فى سلسلة حمض نـــووى ٠

زوج قواعـــد : base pair

قاعدتان ،واحدة فى كل خيط لجزىء حمض نووى مزدوج

بيئة بروث: broth

بيئة مزرعة سائلة لتنمية البكتريات ،يحتوى أحد الطرز العامة منها مستخلص خيرة ،مستخلص عجول ،ملح طعام ومـــاء ٠

فيروس القنبيط المسبب للتورم التاجى فى القرنبيط caulimovirus

مسرطن : مادة كيميائية مسببة للسرطـــان carcinigenesis

خلية : أصغر وحدة من المادة الحية قادرة على الاستمرار بذاتها cell

مستخلص خلـــوى : cell extract or lysate

مخلوط من مكونات خلوية يمكن الحصول عليها بتكسير الخلايا ميكانيكيـــا أو انزيميا ٠ ويعتبر المستخلص الخلوى هو المادة الأولية التى يتحصل منهـــا باحثو الكيمياء الحيوية على الانزيمات والرنا والدنا ٠

اندماج خلوى : cell fusion

التحام بين خليتين جسديتين من نوع واحد أو من نوعين مختلفين ،عن طريـــق

فتحات فى الجدار (أو الغشاء) الخلوى ،بحيث تختلط موادهما الوراثية معـا •

انزيمات السليوليز : cellulases

مجموعة من الانزيمات تحلل السليولوز الموجود على جدر الخلايا النباتيـة •

جدار خلـوى : cell wall

تركيب سميك وصلد يحيطبأنواع معينة من الخلايا خاصة الخلايا البكتيريـة والنباتية ، وعادة تتكون جدر الخلايا من سكرات معقـدة •

جزئ د ن أ كيمرى : chimeric DNA molecule

جزئ د ن أ يشتمل على اثنين أو أكثر من المقاطع من مصادر مختلفة (على سبيل المثال ،د ن أ بلازميد موصل مع شظية د ن أ آدمـى •

الكلاميديا : *Chlamydia trachomatis*

طفيل بينخلوى يسبب مرض الزهـرى •

كروموسوم : chromosome

تركيب تحتخلوى يحتوى على مقطع طويل ومستمر من الـ د ن أ والبروتينات الـتى تنظم وتربط الـ د ن أ •

توليفة كروموسومية جديدة : chromosome rearrangement

اعادة ترتيب مقاطـع الكروموسـوم •

شغط الكروموسوم : chromosome uptake

عملية يتم بمقتضاها التقاط كروموسوم غريب داخل خلية جسدية ،وهى احدى تقنيات الهندسة الوراثية فى الخلايا مميزات النوى ٠

كلون (مستنبت أو مزرعة صنوية) : clone

مجموعة من الخلايا الصنوية جميعها منحدر من سلف واحد ٠

وسائل استزراع: cloning vehicles

جزيئات د ن أ ،كالبلازميد أو الفاج أو فيروس حيوانى ،تستعمل لنقل شظايا د ن أ من أنبوب اختبار الى خلية حية ٠ وهذه الوحدات يمكنها التناسخ داخل الخلايا الحية ٠

وحدة شفرية (كود ون) : codon

ثلاث نوتيدات ترتيبها الدقيق يتكافأ مع واحد من الـ ٢٠ حمضا أمينيا ٠

وسيط إيلاجى : cointegrate

طراز من جزيئات الـ د ن أ يعتقد أنه يتوسط فى عملية تنقل الجينات داخل النواة ٠ ويحتوى الوسيط الايلاجى على د ن أ واهب ،ود ن أ مستقبل ونسختين من العنصر المتنقل ،

تكاملى : complementary

عملية تصف شيئين لهما أشكال تسمح لهما بالتثبت مع بعضهما بشكل محكم مثلا القفل والمفتاح – البريزة والفيشة ،الـ أ مع ث والـ ج مع س فى جزيئات الـ د ن أ ٠

قاعدة تزاوج القواعد التكاملية : complementary base-pairing rule

توجد بعض القواعد التى يمكنها أن ترتص فى وضع عكسى لبعضها البعض فى خيطى الـ د ن أ ،ج تتزاوج مع س ،و أ مع ث (أو مع ى فى الـ ر ن أ) .

د ن أ تكاملى : complementary DNA (cDNA)

جزيئات د ن أ مخلقة من ر ن أ فى أنبوب الاختبار باستعمال انزيم النسخ العكسى ومن ثم يكون تتابع الـ د ن أ هنا متكاملا مع الـ ر ن أ . وعادة مايصنع الـ د ن أ التكاملى من نوتيدات موسومة اشعاعيا ،وهى تستعمل فى مسابر (مجسات) تهجين الأحماض النووية لتحديد تواجد جزيئات معينة من الـ ر ن أ أو الـ د ن أ .

تزاوج اقترانى (فى البكتيريات أو فى الكائنات وحيدة الخلية): conjugation

فى البكتيريات ،يقصد بها عملية تزاوج مابين خلايا حاملة لبلازميد تزاوجى ، يتم بمقتضاها انتقال المعلومات الوراثية (د ن أ) من البكتريم الحامل للبلازميد الى البكتريم الخالى من البلازميد . وفى الكائنات وحيدة الخلية (مثلا البراميسيوم تشمل العملية تبادل نوى أحادى مابين سلالتين مختلفتين .

منطقة ثابتة : constant region

منطقة من جزئ جسم مضاد تكون صنوية لمقطع من جسم مضاد آخر فى فئة معينة من الأجسام المضادة (فى النظام المناعى) .

فيروس كورونا : coronavirus

فيروس يسبب حساسية غير عادية فى التنفس فى الآدميين .

تحول متزامن (لاكثر من جين) : co-transformation

عملية تحول وراثى للخلية تشمل أكثر من صفة فى آن واحد ٠

مرض التدرن التاجـــى : crown gall tumor

ورم فى النباتات نتيجة الاصابـــة بفيــــروس٠

محلول متدرج الكثافـــة : density gradient

محلول تتدرج فيه الكثافة بالتزايد من أعلى لأسفل ،وهو يستعمل ليساعـــد فى فصل الجزئيات الكبيرة فى جهاز الطرد المركـــزى ٠

تهجين الدنأ : DNA hybridization

(انظر تهجيـــن الاحماض النوويــــــة)

انزيم لحام الدنأ (ليجيز الدنأ) : DNA ligase

انزيم يمكنه وصل جزيئين منفصلين من الدنأ من ناحية الأطـــراف٠

انزيم بلمرة الدنأ : DNA polymerase

انزيم يستعمل فى تجميع النوتيدات عند تخليق خيط جديد من الدنأ ٠

إ٠كولاى : <u>E.coli</u> (<u>Escherichia</u> <u>coli</u>)

بكتريات تعيش فى معى الحيوانات الثديية وبضمنها الانســـان ٠

انزيم قاطع : Eco RI

احد انزيمات الاندونيوكلييز المستخلص من إ٠كولاى ،ويمكنه فتح الدنأ فى موقع محدد (باللندروم خـــاص) ٠

established cell culture : مزرعة خلوية راسخة (فى الحيوان) :

fertility factor (F) : عنصر الخصوبة :
(نوع من البلازميدات قابـــل للانتقـــال) .

fetus(adj.fetal) : جنين (فى مرحلة متأخرة من النمو فى الرحـــم) :

exon : إكزون : مقطع مشفر من الجين ينسخ فى الدم .رن أ) :

frameshift (mutation) : طفرة انحراف الاطـــار الشفـــرى :

gel electrophoresis : تفريد كهربى فى الجل (جل إلكتروفوريزس) :

gene cloning : استزراع جينى (كلونة جينية) :

gene expression : تعبيـــر الجيـــن :

gene therapy : علاج جيـــنى :

genetic counseling : استشارة وراثيـــة :

genetic engineering : هندسة وراثيـــة :

germ cell : خليـــة تناسلية (بيضة ـ حيوان منوى ، بويضة ـ حبة لقاح) :

globin : جلوبين (أحد بروتينات الهيموجلوبين المناعيـــة) :

globin genes : جينات تخليق الجلوبيـــن

heavy chain : سلسلـــة ثقيلـــة :

توقيع خرائط من تزاوج جزيئات د ن أ متباينـــة : heteroduplex mapping

خليط النـــوى : heterokaryon

نظيـــر : homologous

عائل : host

خريطة وراثية آدميـــة : human genetic map

هيبريد وما (هجين خلوى حيوانـــى) : hybridoma

منطقة شديد التغير : hypervariable region

مقطع من الاحماض الأمينية فى بروتين الجسم المضاد يتغير من جسم لآخـــر .

مسبب العـــدوى : infectious

انسولين (هرمون تنظيم استهلاك السكر فى الجسم) : insulin

إنترفيرون (بروتين مناعى فى الجسم مضاد للاصابة بالفيروســـات) interferon

إنترون (منطقة غير مشفرة فى الجين ، لاتنسخ فى الـ م ر ن أ) interon

لامبدا (فاج يصيب بكتريا إ . كولاى) : lambda (λ)

اللوكيميا (مرض سرطان الـــدم) : leukaemia

قائد : (تتابع قائد فى الـ ر ن أ) : leader

سلسلة خفيفة (فى البروتين المكون للجسم المضـــاد) : light chain

lysogen ليسوجن: بكتريم مندمج فيه فاج يكسبه مناعة ضد الاصابة بنفس الفاج

lytic cycle دورة تحللية فى البكتريات المصابة بالفاجات

lytic infection عدوى تحللية: بكتريات متحللة نتيجة الاصابة بالفاج

messenger RNA (mRNA) رنأ ناسخ الشفرة الوراثية (م رنأ):

microinjection الحقن الدقيق (لل دنأ):

monoclonal antibodies أجسام مضادة وحيدة الكلـــون:

missense خاطئ المعنى: طفرة تشفر لحمض أمينى خاطئ فى البروتين

mitochondrion(mitochondria) : ميتوكوندريون (جمع: ميتوكوندريات):
جسيمات تحتخلوية تقوم بعملية تحويل الطاقة فى الخلية

mutagen مطفر: (عامل يسبب الطفور ـ كيميائى أو فيزيائـى)

mutant طافر:

mutation طفرة:

myloma ميلوما: خلية سرطانية من الفأر الصيـــنى

nuclease نيوكلييز: انزيم يهدم الأحماض النوويـــة

nucleic acid	جمض نووى: د ن أ ، رن أ أو هجين د ن أ ــ رن أ
nucloid(nu-body)	نوكلويد: (جسم نو = تركيب مكتظ بال د ن أ فى البكتريات)
nucleotide	نوتيدة: وحدة البناء فى ال د ن أ أو ال رن أ
nucleotide pair	زوج نوتيــــدى:
nucleus	نواة :
	نوية :
operator	مشغل : مقطع د ن أ يسيطر على تعبير الجيــــن
operon	أوبرون : سلسلة من الجينات تنسخ فى جزىء واحد من ال م رن أ
origin of replication(ori)	منشأ تناسخ : منطقة بداية تناسخ ال د ن أ
parasexual cycle	د ورة بديلة الـجنس(فى الفطريات ، فى الهجين الخلوية) :
pathogen	باثوجن (كائن مسبب للمرض ، فيروس أو بكتريـــا)
pBR322	بلازميد بكتيرى :(مركب اصطناعيـــا)
penicillin	بنسلين ، مضاد حيوى :
phenylketoneurea	مرض بول الكيتون ؛ مرض وراثى آد مـــى

peptide bond	رابطة ببتيدية: بين الاحماض الامينية لتكوين سلسلة بروتين
phage (bacteriophag)	فاج (بكتريوفاج): فيروس يصيب البكتريات
phage plaques	بقع فاجية: مناطق رائقة يسببها الفاج على مروج البكتريات
pilus(pl. pili)	قناة التزاوج: بين الخلايا البكترية المتزاوجة اقترانيا
plasmid	بلازميد: عنصر وراثي من الـ د ن أ ـ دائري في البكتريات
point mutation	طفرة موضعية: من خلال تبدل أو نقص نوتيدة واحدة في الجين
poly A or poly T tail	بولي أ ـ بولي ث (طرف مفرد من الـ د ن أ أكثر من نوتيدة فردية):
polyethylene glycol	بولي اثيلين جلايكول (مادة تستعمل لزيادة الاندماج الخلوي)
primary cell culture	مزرعة خلوية أولية (في الحيـــوان):
primer	بادئة: مقطع من د ن أ أو ر ن أ يساعد انزيم بلمرة الـ د ن أ على بـــدء نشاطـــه.
probe	مسبر (مجـــس):
progeny	نســل:
promoter	محفز: تتابع نوتيدي من الـ د ن أ يرتبط به انزيم بلمرة الـ ر ن أ عند بدايـــة عمليـــة النســـخ)
protease	بروتييز: انزيم لهدم البروتيـــن
protoplast	بروتوبلاست: خلية نباتية بدون جدار خلـــوي

protoplast fusion — اندماج البروتوبلاستات (فى الخلايا النباتية):

pseudogene — جين كاذب: جين غير فعـــال

rabies — فيروس رابى: (مسبب لمرض الكلـــب)

radioactive — نشط اشعاعيـــا :

radioactive tracer — عنصر نشط اشعاعيا: (يمكن تتبع تحركه داخل الجسم)

recognition site — موقع تعرف (داخل الدنأ لانزيمات التحديد القاطعة) :

recombinant DNA molecule — جزئ دنأ مطعـــم :

recombination — توليفة وراثية جديـــدة :

replica plating — المزارع المكررة (فى البكتريات) :

replication fork — شوكة التناسخ (أثناء تناسخ الدنأ) :

repression — كبت (تثبيـــط):

repressor — كابت: بروتين يكبت أو يثبط نسخ جين

restriction endonucleases — انزيمات الاندونيوكليز المحـــدده :

restriction maps — خرائـــط التحـــديد:

restriction mapping — رسم خرائط التحديـــد :

reverse transcriptase — انزيم النسخ العكسي :

ribosome — ريبسوم :

RNA:DNA hybrid — هجين د نأ : رنأ (جزئ مزدوج الخيط ،خيط واحد من الد نأ وآخر رنأ

RNA polymerase — انزيم بلمرة الـ رنأ :

RNA tumor virus — فيروس رنأ المسبب للأورام :

Sandai virus(SV40) — فيروس ساندای: (أحد فيروسات الانفلونزا)

sequence — تتابع: (قواعد فى الد نأ أو الـ رنأ ،أحماض أمينية فى البروتين)

somaclonal variation — تباين الكلونات الجسدية (فى زراعة الانسجة النباتية):

sperm — حيوان منوى :

sticky ends — أطراف لزجة (فى الد نأ ،كما فى فاج لامبدا الطولى) :

submicroscopic — تحتمجهرى :

subunit — وحدة فرعية :

synthetic vector — ناقل مخلق اصطناعيا :

tetracarcinoma — خلايا سرطانية خاصة :

tetracycline — تتراسيكلين (مضاد حيوى)

thalassemia	تالاسيميا (فاقة = أنيميا البحر المتوسط) ::
thymidine kinase	ثيميين كينيز (انزيم) :
toxin	توسكين: (سم بروتينى بكتيرى)
transcription	نسخ :(الشفرة الوراثية من الد ن أ الى الم ر ن أ)
transfer RNA(tRNA)	ت ر ن أ (رن أ مترجم الشفرة الوراثية) :
transduction	استنقال :نقل وراثي بالفاج
transformation	تحول :(وراثى)
translation	ترجمة :(للشفرة الوراثية)
transposon	عنصر وراثى متنقل :
tryptophan	التريبتوفان (حمض أمينى) :
variable region	منطقة متغيرة : مقطع فى جزيئات الأجسام المضادة
vector	ناقل : فيروس ـ فاج ـ بلازميد

المراجـــع

لمزيد من المعرفة فى مجالات علوم الوراثة والهندسة الوراثية ينصح القارئ بالرجوع الى العديد من المراجع والتى سوف نعرض بعضا منها فيما يلى ٠

أولا : مراجع عربيـــة :

١ ـ الوراثة : تأليف أورسولا جود ينف (١٩٨١) ـ ترجمة : أ ٠د ٠ هاشم حسين وأ ٠د ٠ احمد الشرقاوى ـ مراجعة : أ ٠د ٠ عبد الرؤوف سليم ـ الناشر : مؤسسة الأهرام (١٩٨٢) ـ القاهرة ٠

٢ ـ مبادئ علم الوراثة : تأليف إلدون ج ٠جارد نر وبيترسنستاد (١٩٨٤) ـ ترجمة أ ٠د ٠ احمد شوقى وأ ٠د ٠ فتحى عبد التواب وأ ٠د ٠ على زين العابدين وأ ٠د ٠ ممدوح أبوالمحاسن مراجعة : أ ٠د ٠السيد حسن حسانين ـ الناشر : الدار العربية للنشر والتوزيع (١٩٨٧) ـ القاهرة ٠

٣ ـ علم الوراثة الحديث : تأليف : أ ٠د ٠ هاشم حسين (١٩٨٦) ـ الناشر : مطبعة كلية الطب البيطرى ـ جامعة القاهرة ٠

٤ ـ صناعة الحياة : تأليف : إدوارد يوكسين (١٩٨٣) ـ ترجمة أ ٠د ٠ احمد مستجير ـ الناشر : مكتبة غريب (١٩٨٥) ـ القاهرة ٠

٥ـ طبيعة الحياة: تأليف: فرانسيس كريك (١٩٨٥) ـ ترجمة أ.د. أحمد مستجير ـ الناشر: عالم المعرفة (١٩٨٨) ـ الكويت.

ثانيا: مراجع باللغة الانجليزية:

1. Hanson, E.D. (1983): Recombinant DNA Research and the Human Prospects, ed. American Chem. Soc., WA.

2. Glover, D.M. (1986): DNA Cloning, ed. IRL, Oxford.

3. Goodenough, Ursula (1984): Genetics, 3rd ed., Holt-Saunders Int.

4. Drlica, K. (1984): DNA and Gene Cloning, John Wiley & Sons, New York.

5. Lewin, Benjamin (1987): Genes, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

6. Strickberger, M.W. (1985): Genetics, 3rd ed., Macmillan, London & New York.

7. Warr, J.R. (1984): Genetic Engineering in Higher Organisms, Edward Arnold, GB.

8. Esser, K. et al. (1986): Plasmids of Eukaryotes, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York & Tokyo.

9. Beridze, Th. (1986): Satellite DNA, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

10. Schell, J.S. and P.Starlinger (1984): The Impact of Gene Transfer Techniques in Eukaryotic Cell Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York & Tokyo.

11. Stent, G.S. and R.Calender (1986) : Molecular Genetics, 2nd ed. New Delhi.

تم بحمد من اللـــــه وتوفيقـــــه

رقـــم الايـــداع بدار الكتب: ١٩٨٩/٩٠٠٧

